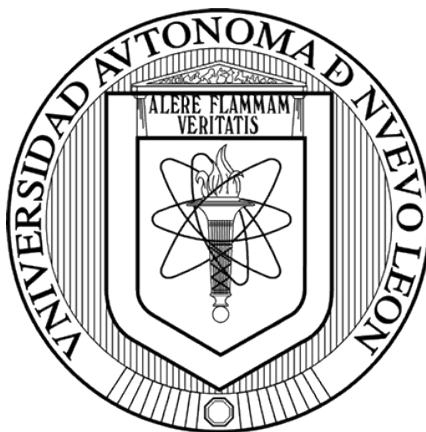


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**INACTIVACIÓN DE NOROVIRUS MEDIANTE COMPUESTOS
NATURALES**

POR

LIC. DIANELYS SOTOLONGO RODRÍGUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

DICIEMBRE, 2017

**INACTIVACIÓN DE NOROVIRUS MEDIANTE COMPUESTOS
NATURALES**

COMITÉ DE TESIS

**DRA. NORMA LAURA HEREDIA
PRESIDENTE**

**DR. ÁNGEL MERINO MASCORRO
SECRETARIO**

**DR. JOSE SANTOS GARCÍA ALVARADO
VOCAL 1**

**DR. JORGE ESTÉBAN DE JESÚS DÁVILA AVIÑA
VOCAL 2**

**DR. EDUARDO FRANCO FRÍAS
VOCAL 3**

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de los Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Heredia, la codirección del Dr. Santos García y la asesoría del Dr. José Ángel Merino Mascorro, el Dr. Eduardo Franco Frías y el Dr. Jorge Estéban de Jesús Dávila Aviña. El presente trabajo fue financiado parcialmente por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la U.A.N.L.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

A la Dra. Norma Laura Heredia por permitirme ser parte de su laboratorio y al Dr. José Santos García.

Al Dr. José Ángel Merino por todas las enseñanzas y por siempre estar ahí para aconsejarme, por la paciencia y por la bonita amistad que me has brindado.

A los compañeros del en la Unidad de Virología y Cáncer por apoyarme en mis ensayos y brindarme su conocimiento.

A Mayra Meléndez por ser amiga y compañera de trabajo por su amistad y su conocimiento.

A mis amigos Hugo, Alejandra, Lupita, Laura, Dante y Caro por brindarme su amistad, su cariño y hacer mi estancia agradable y divertida.

A la familia Lazcano por brindarme su hogar y su apoyo.

A mi madre, mi hermano y mi tía Esperanza por apoyarme en esta etapa de mi vida y confiar en mí y darme su amor.

A todas las personas que me ayudaron de alguna manera a vivir esta etapa en este bello país.

Besos y agradecimientos a todos.

DEDICATORIA

A mi madre, Carelia Rodríguez Batista, por siempre apoyarme en mis decisiones, por impulsarme a siempre ser mejor persona, por todo su amor y por ser el pilar de mi vida y ser parte fundamental para la realización de mis metas.

A mi tía Esperanza Rodríguez Batista por apoyarme en todo, por estar en momentos de crisis y por ser una segunda madre.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
LISTADO DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Gastroenteritis y epidemiología.....	3
2.2 Norovirus y cambio climático.	4
2.3 Modelos para el estudio de NoV	6
2.4 Estructura y replicación de NoVs.....	8
2.6 Vías de transmisión	12
2.7 Agentes neutralizantes de NoVs.....	13
2.8 Prevención y control.....	15
2.9 Compuestos flavonoides como agentes antivirales	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVO GENERAL.....	21
5.1 Objetivos específicos.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Cultivo de la línea celular de macrófagos RAW 264.7	22
6.2 Producción de partículas virales.....	22
6.3 Cuantificación viral mediante la técnica de TCID ₅₀ (Dosis de infección de cultivo de tejidos)	23
6.4 Detección molecular del MNV producido	23
6.5 Cuantificación viral mediante la técnica de unidades formadoras de placas (UFP) 25	
6.6 Compuestos naturales.....	26
6.7 Ensayos de citotoxicidad	26
6.8 Evaluación de la actividad antiviral por medio de RT-qPCR	27
6.9 Ensayo de actividad antiviral de los compuestos en un modelo de manos .	27
7. RESULTADOS.....	29
7.1 Estandarización del cultivo de la línea celular Raw 264.7 y la producción de MNV 29	
7.2 Cuantificación viral mediante Unidades formadoras de Placas (PFUs).....	30

7.3	Cuantificación viral mediante RT- q PCR.	31
7.1	Ensayo de citotoxicidad para los compuestos seleccionados.	32
7.2	Evaluación de la actividad antiviral de los flavonoides	33
7.3	Evaluación de la actividad antiviral de los compuestos en un modelo de manos.....	35
8.	DISCUSION.	37
9.	CONCLUSIONES.	43
10.	PERSPECTIVAS	44
11.	BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla.1. Protocolo de síntesis de cADN	23
Tabla.2. Protocolo para la detección de MNV por PCR punto final.....	23
Tabla.3. Resumen de la comparación de las medias del número de copias genómicas entre los diferentes compuestos a las tres concentraciones.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.1. Organización y estructura del genoma de HuNoV	9
Figura.2. Composición y ciclo de vida de HuNoVs	10
Figura.3. Esquema de la titulación viral mediante TCID50	22
Figura.4. Crecimiento y proliferación de la línea celular RAW 264.7 en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, e incubadas a 37°C, 95% O ₂ y 5% CO ₂	28
Figura.5. Infección con MNV de la línea celular RAW 264.7. A) Células sin infectar B) ECP de MNV en células RAW 264,7 a 72h post-infección –	28
Figura.6. Detección molecular de MNV.S1: Control positivo, S2 y S3: virus producido	29
Figura.7. A) Efecto citopático observado en el ensayo TCID50 en placas de 6 pocillos. B) Observación microscópica de las células RAW264.7Células sin infectar (Izq) células RAW264.7 infectadas con dilución -1. (Centro) células RAW264.7 infectadas con la dilución -2 (Der).	29
Figura.8. Observación al microscopio de las placas formadas por MNV. A la izquierda se observan las placas en el objetivo 40x y en la figura a la derecha se observan las placas en el objetivo 20x	30
Figura.9. Observación macroscópica de la técnica de PFUs. Las letras (c) representan los controles celulares	30
Figura.10. Curva patrón de MNV	31
Figura.11. Porcentaje de viabilidad celular de la línea Raw 264.7 en presencia de Quercentina y Naringenina por 1h a tres concentraciones (125,250 y 300μM)	31
Figura.12. Efecto de los flavonoides (catequina, vainillina, hesperedina, naringenina y quercentina) a tres concentraciones 125,259 y 300μM sobre el número de copias genómicas, posterior a 1h de incubación con MNV en la línea celular Raw 264.7.	33
Figura.13. Representación gráfica de la capacidad de inactivación de MNV en un modelo de manos artificialmente contaminado. Los compuestos quercentina y naringenina se evaluaron a la concentración de 300 μM, el tiempo de contacto entre virus y compuesto fue de 15s	35

LISTADO DE ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígenos
CG	Número de copias genómicas
CHD	Cardiopatía congénita
CI	Control infeccioso
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECP	Efecto citopático
FCV	Calicivirus felino
FSB	Suero fetal bovino
HAV	Virus de la hepatitis A
HBGA	Antígeno del histo-grupo sanguíneo
HCMV	Citomegalovirus
HSV	Virus de Herpes Simple
HuNoV	Norovirus humano
IL	Interleucina
IRF	Interferón
MNV	Norovirus murino
NoV	Norovirus
PLV	Poliovirus
RdRp	RNA dependiente-RNA polimerasa
RHDV	Virus de la Enfermedad Hemorrágica del conejo
RNA	Ácido Ribonucleico
UFP	Unidades Formadoras de Placas
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Los Norovirus Humanos (HuNoV) representan la causa principal de brotes de gastroenteritis no bacteriana en el planeta y son la causa más común de diarrea severa en niños. En la actualidad no se ha desarrollado un tratamiento efectivo contra esta enfermedad ya que la sanitización basada en soluciones de cloro utilizada en la industria alimenticia, así como los lavados de manos con agua y jabón, han resultado ineficientes para lograr la remoción total del patógeno; además no existen vacunas eficientes debido a su gran variabilidad genética y la falta de un modelo robusto de estudio. Recientemente se han realizado estudios con compuestos naturales, polifenoles, flavonoides proantocianinas y taninos que han mostrado actividad anti-HuNoVs. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de inactivación de Norovirus Murino (MNV) como modelo para HNoV por 5 flavonoides: vainillina, naringenina, hesperedina, catequina, y quercentina. Se estandarizó el cultivo de la línea celular RAW 264.7 y la producción de MNV en la línea celular hasta alcanzar un título de 10^{-2} TCID₅₀/0.1ml. Se evaluó la actividad antiviral de la vainillina, naringenina, hesperedina, catequina y quercentina a 125, 250 y 300µM. Los compuestos quercentina y naringenina redujeron hasta 2 log el número de copias genómicas de MNV a la concentración de 300µM. Se evaluó la toxicidad a la línea celular por quercentina y naringenina a las tres concentraciones. La viabilidad celular por exposición de una hora a 125, 250 y 300µM de quercentina fue de 86 y 60% respectivamente, mientras que para naringenina fue de 73 y 18%. Se evaluó la actividad anti-MNV de estos dos compuestos (300µM) en un modelo de manos, encontrando que el tratamiento con quercentina disminuyó de 714 a 452 las copias genómicas del virus, mientras que con el tratamiento con naringenina se observó un incremento de 428 a 532 copias genómicas. Por lo tanto, se propone a la quercentina como un ingrediente prometedor para la formulación de un gel o solución desinfectante de manos.

ABSTRACT

Human Noroviruses (HuNoV) are the leading cause of outbreaks of non-bacterial gastroenteritis on the planet and are the most common cause of severe diarrhea in children. At present, no effective treatment has been developed against this disease since sanitization based on chlorine solutions used in the food industry, as well as handwashing with soap and water, have been inefficient in achieving the total removal of the pathogen.; in addition there are no efficient vaccines due to their great genetic variability and the lack of a robust study model. Recently, studies have been carried out with natural compounds, polyphenols, proanthocyanins flavonoids and tannins that have shown anti-HuNoVs activity. The objective of the present work was to evaluate the inactivation capacity of Murine Norovirus (MNV) as a model for HNoV by 5 flavonoids: vanillin, naringenin, hesperedin, catechin, quercetin. The culture of the RAW 264.7 cell line and the production of MNV in the cell line were standardized to a titre of 10^{-2} TCID₅₀ / 0.1ml. The antiviral activity of vanillin, naringenin, hesperedin, catechin and quercetin at 125, 250 and 300 μ M was evaluated. The quercetin and naringenin compounds reduced up to 2 log the genomic copy number of MNV at the maximum concentration (300 μ M). Cytotoxicity was evaluated for the quercetin and naringenin compounds at all three concentrations. The cell viability for one hour exposure to 125, 250 and 300 μ M quercetin was 86, 95 and 60% respectively, whereas for naringenin it was 73, 35 and 18%. The anti-MNV activity of these two compounds (300 μ M) was evaluated and found that quercetin treatment decreased from 714 to 452 genomic copies of the virus, whereas with naringenin treatment an increase of 428 to 532 genomic copies was observed. Therefore quercetin is proposed as a promising ingredient for the formulation of a gel or hand disinfecting solution.

1. INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis, tanto epidémica como esporádica, presenta alta morbilidad y mortalidad entre personas de todas las edades, causando de 5 a 8 millones de muertes al año (Robilotti *et al.*, 2015). Los principales afectados son niños menores de 5 años y ancianos, de los cuales se han reportado 1.8 millones de muertes al año (Patel, Hall, Vinjé, y Parashar, 2009). Las gastroenteritis pueden ser causadas por varios agentes entre los que se encuentran virus y bacterias; no obstante, los Norovirus Humanos (HuNoVs) son la principal causa de brotes de gastroenteritis no bacteriana y son la causa más común de diarrea severa en niños (Cremon *et al.*, 2010; Koo, Ajami, Atmar, y DuPont, 2010; Payne *et al.*, 2013), provocando alrededor del 90% de los casos. Aunque las infecciones por HuNoVs suelen causar enfermedades autolimitantes, cuyos síntomas se alivian dentro de 24 o 72 h, en el caso de las infecciones crónicas pueden causar síntomas severos, principalmente en pacientes inmunocomprometidos, en los que estas infecciones se vuelven intratables (Bok y Green, 2012). Actualmente no existe un tratamiento adecuado ni vacunas efectivas contra la gastroenteritis producida por HuNoVs (Karst, 2014). Incluso se pueden presentar infecciones asintomáticas que promueven la propagación del virus (Barclay *et al.*, 2014). Los brotes generalmente ocurren en centros médicos, hospitales, asilos de ancianos, así como en restaurantes, escuelas o guarderías, en barcos y cruceros (Patel *et al.*, 2009). Los HuNoVs han sido asociados al consumo de frutas frescas, vegetales, mariscos, productos lácteos y agua (Kim, *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2015). La transmisión se puede ver favorecida por diversos factores, los cuales incluyen el lugar de convivencia, la carga viral, factores ambientales, resistencia a procesos de desinfección y contaminación ambiental (Duizer *et al.*, 2004).

Los HuNoVs son virus pequeños de RNA, no envueltos, pertenecientes a la familia *Calciviridae* (Bok y Green, 2012). Estos poseen una cadena simple de polaridad positiva de aproximadamente 7.4–7.7 Kb. Mientras que el extremo 3' se encuentra poliadenilado, el extremo 5' se encuentra unido covalentemente a una proteína viral no estructural (proteína VPg; Karst, 2014). Además el genoma de los Norovirus clásicos poseen tres marcos abiertos de lectura (ORFs), ORF1 codifica para 6 proteínas no estructurales, mientras que ORFs 2 y 3 codifican para las proteínas de cápside mayor y menor, conocidas como VP1 y VP2 (McFadden *et al.*, 2011). El género está segregado en por lo menos 5 y posiblemente 6 genogrupos (genogrupos

I-VI), de los cuales los genogrupos I, y IV incluyen a virus humanos asociados a gastroenteritis (Zheng *et al.*, 2006). Debido a la falta de un modelo robusto para el estudio de los Norovirus, el modelo de Norovirus Murino (MNV) ha surgido como un sustituto ideal para el estudio de los HuNoVs, aunque existen algunas diferencias en cuanto a los síntomas de infección (Vashist, *et al.*, 2011). Los MNVs se han convertido en el candidato ideal ya que comparten muchas de las características genéticas y bioquímicas con los HuNoVs, así como modos de transmisión y resistencia a ácidos (Bozkurt, *et al.*, 2015). Por estas razones ha resultado ser el más eficiente de los sustitutos utilizados en estudios para aumentar la comprensión sobre la biología de los HuNoVs (Ryu *et al.*, 2015).

Las manos son una de las principales fuentes de contaminación, ya sea en brotes de origen doméstico o por contaminación cruzada (Sattar *et al.*, 2002). Actualmente el saneo basado en soluciones de cloro es el método de descontaminación primario para la remoción del patógeno. Sin embargo, se ha demostrado que no es completamente eficiente en la remoción de algunos sustitutos de HuNoVs, además de no poder ser utilizado en el lavado de manos (Baert, Debevere, y Uyttendaele, 2009). La búsqueda de compuestos naturales que puedan ser utilizados como ingredientes de un gel o solución desinfectante de manos se hace necesaria, por lo que en este proyecto se pretendió proponer compuestos naturales para la inactivación de MNV.

2. ANTECEDENTES

2.1 Gastroenteritis y epidemiología.

Los HuNoVs son la principal causa de gastroenteritis no bacteriana a nivel mundial, siendo el agente causal de alrededor de 90% de los casos (Lopman *et al.*, 2012; Patel, *et al.*, 2009). La gastroenteritis tanto epidémica como esporádica presenta una alta morbilidad y mortalidad entre personas de todas las edades, causando de 5 a 8 millones de muertes al año (Lopman *et al.*, 2012; Payne *et al.*, 2013). Los principales afectados son niños menores de 5 años y ancianos de los cuales se han reportado alrededor de 1.8 millones de muertes al año. Las enfermedades gastrointestinales son un problema mundial, primordialmente en países en vías de desarrollo, en donde los índices de mortalidad son elevados; en Asia, África y Latinoamérica, se estima que aproximadamente el 50% de niños menores de 5 años es afectado por esta enfermedad (Koo, *et al.*, 2010; Payne *et al.*, 2013).

Las infecciones por HuNoVs suelen causar una enfermedad autolimitante, cuyos síntomas se alivian dentro de 24 o 72 h. No obstante en el caso de las infecciones crónicas pueden causar síntomas severos, principalmente pacientes inmunocomprometidos, en los que estas infecciones se vuelven intratables (Bok y Green, 2012).

La gastroenteritis es una afección asociada a procesos no inflamatorios en intestino delgado e inflamatorios a nivel de colon (Lin *et al.*, 2015; Robilotti *et al.*, 2015). Entre los síntomas que comúnmente se presentan están diarrea, vómito y fiebre. Los HuNoVs también han sido asociados a casos de enterocolitis necrosante, convulsiones en infantes, encefalopatías, pneumatosis intestinales y coagulación intravascular diseminada (Patel *et al.*, 2009).

La prevalencia de NoVs asociados a casos de gastroenteritis esporádicas está pobremente documentada y subestimada en algunos países. No obstante desde 1990 hasta la fecha las herramientas moleculares han permitido relacionar la presencia del virus a los casos presentados (Ahmed *et al.*, 2014). Los ensayos de RT-PCR han permitido detectar la presencia de NoVs en casos con síntomas de gastroenteritis (Scipioni *et al.*, 2008; Bok y Green, 2012). De esta manera se ha podido constatar la presencia de este virus en casos de gastroenteritis esporádicas. Un estudio reciente

que examinó la presencia de NoVs en pacientes hospitalizados demostró que el virus estaba presente en alrededor del 12% de todos los casos de gastroenteritis severa en niños menores de 5 años. Consecuentemente los NoVs parecen ser el agente causal de diarrea endémica en niños, secundando a rotavirus como los primeros causantes de gastroenteritis severa en infantes (Koo *et al.*, 2010; Payne *et al.*, 2013).

Los pacientes afectados por esta enfermedad reciben principalmente tratamientos paliativos. La rehidratación oral es importante, ya que provee de electrolitos fundamentales y azúcares (Goodfellow *et al.*, 2015). Los pacientes que presentan síntomas marcados de deshidratación o que no toleran la administración de fluidos oralmente le son administrados por vía parenteral (Bok and Green, 2012). La terapia de antibióticos no es efectiva en casos de gastroenteritis viral por lo que se evita su uso ya que puede resultar dañino al administrarse a niños, particularmente a menores de 3 años (de Graaf *et al.*, 2014).

2.2 Norovirus y cambio climático.

Existen muchas formas en las cuales el cambio climático puede afectar la incidencia de gastroenteritis bacterianas y virales a nivel mundial, tales como cambios en temperatura, patrones de precipitación, aumento de la intensidad o frecuencia de climas extremos, calentamiento de los cuerpos de agua, acidificación y cambios en las rutas de transporte de contaminantes (Lyse´n *et al.*, 2009; Semenza *et al.*, 2012).

Los aumentos bruscos de temperatura y cambios en los patrones de precipitación ejercen una gran influencia en la persistencia de bacterias, virus, parásitos y hongos, así como en los patrones de incidencias de las enfermedades asociados a estos (Koopmans, 2008). Los cambios climatológicos también tienen un impacto en la ecología microbiana y el crecimiento de los microorganismos, la fisiología vegetal y animal y la susceptibilidad del huésped. Esto puede dar lugar a la aparición, redistribución y cambios en la incidencia e intensidad de enfermedades de plantas y animales e infestaciones de plagas así como las enfermedades transmitidas por los alimentos y las zoonosis (Semenza y Menne, 2009; FAO, 2008c).

El cambio climático puede afectar las infecciones virales en tres niveles: cambio en los patrones de transmisión, cambio en la ecología del huésped y cambios socioeconómicos que afectan a las poblaciones del huésped, modulando entonces los

patrones resultado epidemiológicos, la morbilidad y mortalidad de las enfermedades infecciosas virales (Tirado *et al.*, 2010). Los picos de incidencia de infecciones por HNoV se encuentran altamente definidos, dándose principalmente en invierno (de octubre a abril) y picos específicos en febrero y marzo (Bradt *et al.*, 2005; Semenza *et al.*, 2012).

Sin embargo, pueden ocurrir brotes de HNoV durante el verano, caracterizados por la persistencia de gastroenteritis en la llamada temporada baja (mayo a septiembre, Tirado *et al.*, 2010). Los brotes esporádicos de infecciones por HNoVs en verano pueden estar asociados a la limitada circulación de virus durante esta época del año, mostrando una supervivencia a largo plazo en la población del huésped y una reactivación estacional (Bambrick *et al.*, 2008).

Los cambios en las condiciones ambientales han sido asociados con la estacionalidad de las enfermedades infecciosas y algunos reportes han demostrado una relación entre humedad y persistencia viral. Los rotavirus se ven favorecidos por cambios en la humedad la cual facilita su persistencia, aumentando el riesgo de transmisión a través de superficies contaminadas (Jones *et al.*, 2014). Observaciones similares fueron hechas en influenza, mientras que en poliovirus se ha reportado una asociación positiva entre la prevalencia de la enfermedad y la humedad del aire (Semenza *et al.*, 2012).

En el caso de los HNoVs que se transmiten no sólo a través de la vía fecal-oral, sino también a través de aerosoles (vómito), el aumento de la humedad puede facilitar potencialmente la transmisión del virus (Eden *et al.*, 2014). Es posible que los cambios en la humedad y la temperatura puedan influir en la resistencia, transmisión y/o virulencia de las partículas virales (Baer *et al.*, 2009).

La sobrepoblación y el hacinamiento es uno de los factores que aunado al cambio climático explican el aumento de la transmisión e incidencia de las infecciones gastrointestinales (Repp *et al.*, 2013). Ciertos modelos de transmisión muestran que algunos patrones de infección dependen de la tasa de contacto. Estas evidencias se ven reforzadas por la gran incidencia de brotes en escuelas primarias, hospitales sobrepoblados y cruceros (de Graaf *et al.*, 2014).

Las fluctuaciones estacionales modulan también la función inmune celular y humoral, potencialmente aumentando la susceptibilidad de los mamíferos a la infección (Urashima *et al.*, 2010). La vitamina D es un regulador importante de la función de los fagocitos y está asociada con la respuesta antiviral a la infección por

el virus influenza. Durante el invierno, la disminución de la radiación UV reduce la síntesis de vitamina D, con posterior deterioro de la respuesta inmune y un posible aumento de la susceptibilidad del hospedero a la infección (Wu *et al.*, 2010). Aunque en el caso de las infecciones por HNoVs esta relación no está completamente dilucidada puede resultar ser una dirección interesante hacia la comprensión de la estacionalidad del norovirus (Thornton *et al.*, 2013).

El cambio climático influye directamente en la temperatura, precipitación, la duración estacional y la intensidad de los episodios, y las concentraciones atmosféricas de CO₂ (Semenza *et al.*, 2012). Las variaciones climáticas extremas, como los inviernos fríos, las olas de calor, las inundaciones y los cambios de temperatura, son importantes moduladores de la transmisión de agentes infecciosos y su supervivencia en entornos naturales. Por esta razón se espera que la estacionalidad de las infecciones por HNoVs también sea afectada con un impacto significativo en transmisión y resistencia del virus y la susceptibilidad del hospedero (Tirado *et al.*, 2010).

Como consecuencia de las inundaciones o las sequías, el desplazamiento masivo de poblaciones y el hacinamiento en los campamentos de refugiados pueden facilitar la introducción de NoVs en poblaciones inmunológicamente deprimidas, lo que provocará epidemias y la aparición de nuevas cepas de HNoVs (Eden *et al.*, 2014). En este contexto, el cambio climático puede modular la evolución del virus favoreciendo períodos de transmisión elevada o facilitando la transmisión y los cuellos de botella evolutivos a través de eventos rápidos de mutación o recombinación (de Graaf *et al.*, 2014).

2.3 Modelos para el estudio de NoV

A pesar del avance en el conocimiento de los NoV en los últimos 10 años en cuanto al entendimiento de su biología, no se ha logrado la producción de una vacuna efectiva o antivirales adecuados, esto ha sido en parte debido a la falta de un modelo de estudio (Karst, 2014; Ryu *et al.*, 2015). Células del epitelio gastrointestinal humano, así como otros tejidos animales han sido probados, y mostraron resistencia a la propagación viral (Duizer *et al.*, 2004). No obstante se han realizado numerosos esfuerzos por obtener un modelo de cultivo eficiente para los HuNoVs (Vashist *et al.*, 2011)

El MNV ha surgido como un sustituto ideal de los HuNoVs para su estudio (Mccartney *et al.*, 2008), aunque existen algunas diferencias en cuanto a los síntomas de infección. Sin embargo comparte muchas de las características genéticas y bioquímicas con los HuNoVs, así como modos de transmisión y resistencia a ácidos (Mumphrey *et al.*, 2007;McFadden *et al.*, 2011). Los MNV se encuentran estrechamente relacionados a los NoVs (Hewitt, *et al.*, 2009).

Desde un punto de vista molecular, el MNV comparte muchas características bioquímicas y genéticas con los HNoVs. El MNV tiene de 28 a 35 nm de diámetro, la forma icosaédrica y la densidad flotante de 1.36 a 0.04 g/cm³ característica de los HNoVs, no presenta envoltura y es de ARN de polaridad positiva, compuesto por 7,382 nucleótidos (Sosnovtsev *et al.*, 2006).

La región codificante está flanqueada por una pequeña porción de 5 nt en el extremo 5' y de 75 nt en extremo 3' seguido por una cola de PoliA (Karst *et al.*, 2003). Su genoma presenta cuatro ORFs; en donde el ORF1 codifica para una gran poliproteína que es escindida postranscripcionalmente para producir las proteínas no estructurales encargadas de la replicación (Yunus *et al.*, 2010). ORF2 codifica para una proteína estructural mayor VP1, ORF3 codifica para una proteína estructural menor y ORF4 para una proteína de funciones desconocidas (Sosnovtsev *et al.*, 2006).

El procesamiento proteolítico de la poliproteína ORF1 en algunas de las proteínas no estructurales de MNV puede visualizarse en células RAW 264.7 infectadas con el virus. Se replican en cultivos de células dendríticas y presenta un tropismo por macrófagos. El MNV también se replica robustamente en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, (Wobus, *et al.*, 2006; Hewitt, *et al.*, 2009).

Otra de las razones por las cuales este virus es un sustituto adecuado para el estudio de los HuNoVs es que su huésped se encuentra bien caracterizado y la relación costo beneficio es positiva (Vashist *et al.*, 2011). Esto ha permitido dilucidar aspectos de la replicación de los NoVs y de la expresión de un ARN subgenómico y el reordenamiento de las membranas intracelulares durante la replicación viral.

No obstante es importante tener en cuenta algunas diferencias, tales como que la infección por MNV es generalmente persistente y los síntomas de la enfermedad difieren a los provocados por otros NoV, también la variabilidad genética es menor que la que presentan los HuNoVs (Hsu *et al.*, 2007).

Se ha utilizado también como modelo de estudio al Calicivirus felino (FCV) debido a su similitud en cuanto a secuencia del genoma y organización, sin embargo el FCV es un virus que ataca a felinos, causa infecciones respiratorias y no tolera condiciones acidez (Doultree *et al.*, 1999; Gehrke, *et al.*, 2004). Varios virus de esta familia se han utilizado y en dependencia del objetivo del estudio, se pueden utilizar otros sustitutos virales como, Sapovirus, el Virus de Tulane y el Virus de la Enfermedad Hemorrágica del conejo (RHDV), estos modelos resultan útiles en los estudios relacionados con el ciclo replicativo de NoVs (Vashist *et al.*, 2011).

2.4 Estructura y replicación de NoVs.

Los NoVs son virus pequeños, no envueltos, pertenecen a la familia *Caliciviridae*. Estos poseen una cadena simple de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 7.4–7.7 Kb (Robilotti, *et al.*, 2015). El extremo 3' se encuentra poliadenilado y el extremo 5' se encuentra unido covalentemente a una proteína viral no estructural, conocida como proteína VPg (Eden *et al.*, 2014). Su genoma posee tres ORFs, el ORF1 codifica para una poliproteína que es escindida co-transcripcionalmente y pos-transcripcionalmente por proteasas virales, dando lugar a seis proteínas no estructurales, mientras que los ORF2 y ORF3 codifican para las proteínas de cápside mayor y menor, conocidas como VP1 y VP2 (Robilotti, *et al.*, 2015).

El virus de Norwalk el cual es el prototipo del genero Norovirus produce partículas virales pequeñas (27nm), redondas y no envueltas (Doultree, *et al.*, 1999) (de Graaf *et al.*, 2016). La cápside viral icosaédrica está compuesta por 90 dímeros de la proteína VP1, los cuales constituyen el dominio de la cáscara (S) y un dominio protuberante (P) similar a las células dendríticas y los macrófagos (Vongpunsawad *et al.*, 2013). El dominio P es responsable de la unión a los antígenos del histo-grupo sanguíneo (HBGAs), que funcionan como receptores o co-receptores en las células huésped, y contiene importantes determinantes de la antigenicidad. Las partículas virales contienen sólo unas pocas copias de VP2, que están asociadas con la superficie interior de la cápside formada por el dominio S de VP1 (Donaldson *et al.*, 2010; Vongpunsawad *et al.*, 2013)

Los NoVs no tienen un mecanismo adecuado de reparación de errores durante la replicación, por lo tanto adquieren una gran diversidad genética. El género

esta segregado en por lo menos 5 y posiblemente 6 genogrupos (genogrupos I-VI), cada uno de los cuales se subdivide en varios genotipos o subtipos. La mayoría de los HuNoVs se encuentran en los genogrupos I y II. Mucho de los HuNoVs asociados a gastroenteritis están en los grupos GII4 el cual es un subgrupo del genogrupo II (Ryu *et al.*, 2015).

La comprensión de los mecanismos de traducción y replicación de los HuNoVs se ha visto obstaculizada por la falta de un sistema de cultivo celular. No obstante gracias a la implementación de replicones de HuNoVs y el uso de sustitutos virales se han dilucidado algunos aspectos de la replicación (de Graaf *et al.*, 2016)

El complejo de replicación de NoV está asociado con vesículas membranosas intracelulares inducidas por virus. La localización de proteínas no estructurales a las membranas de la vía secretora temprana y tardía ha sugerido un papel para estas vías en la replicación de la formación de complejos (Thorne *et al.*, 2014). La formación del complejo de replicación también implica la red citoesquelética, lo que permite el establecimiento del complejo de replicación en estrecha proximidad a la red de organización de microtúbulos de la célula huésped (Donaldson *et al.*, 2010).

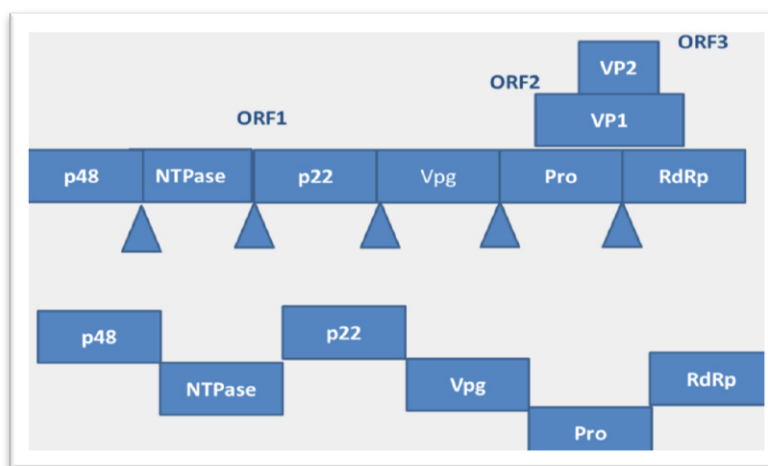


Fig.1. Organización y estructura del genoma de HuNoV (Imagen modificada de de Graaf *et al.*, 2016)

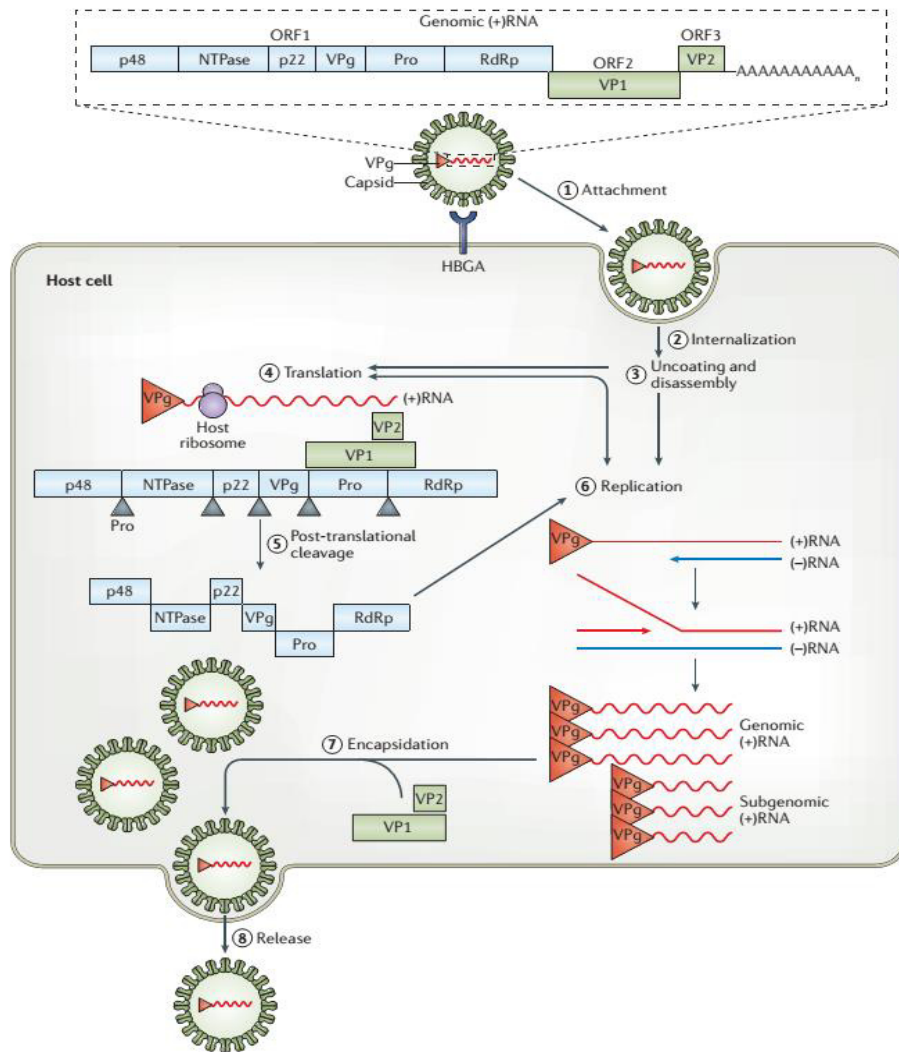


Fig.2. Composición y ciclo de vida de HuNoVs (Imagen tomada de de Graaf *et al.*, 2016)

El genoma del NoV tiene tres ORFs, que codifican para una poliproteína (abarcando seis proteínas no estructurales individuales) y las proteínas estructurales VP1 y VP2. El genoma viral constituido de ARN en sentido (+) es encapsulado en la cápside formada por VP1 y VP2. La cápside se adhiere a la superficie celular a través de interacciones entre VP1 y HBGA. Posteriormente se internaliza, y se desensambla. El RNA (+) se transcribe entonces y se traduce en el citoplasma de la célula huésped (de Graaf *et al.*, 2016).

La traducción está mediada por factores de traducción del huésped que son reclutados por la proteína viral no estructural VPg, que se une covalentemente al extremo 5' del genoma. A continuación la poliproteína, que está codificada por ORF1, es escindida post-traducionalmente por una proteasa codificada por el virus (también conocido como NS6) obteniéndose el resto de las proteínas no

estructurales: p48, NTPasa, p22, Vpg, Pro y RdRp (ARN dependiente-ARN polimerasa, Debbink *et al.*, 2014; Karst *et al.*, 2014)

Durante la replicación del genoma, el ARN (+) es transcrito en ARNs de sentido negativo que son utilizados como molde para la síntesis de nuevos ARN genómicos y subgenómicos (+), respectivamente. Los ARNs subgenómicos (+) contienen sólo ORF2 y ORF3, y son utilizados para la producción de VP1 y VP2 (Karst *et al.*, 2014). Durante la encapsidación los ARNs (+) genómico y subgenómico es empaquetado en nuevos viriones, que posteriormente se liberan de la célula huésped infectada, aunque el mecanismo mediante el cual la liberación se produce en gran parte no se conoce (Thorne *et al.*, 2014).

Una de las dianas fundamentales de los NoVs son las células presentadoras de antígenos (APCs, Wobus *et al.*, 2004). El MNV puede replicarse eficazmente en células dendríticas primarias y macrófagos. Además, el antígeno viral ha sido detectado en células co-teñidas con un marcador de macrófagos y células que se asemejan morfológicamente a células dendríticas y macrófagos, así como un número de líneas celulares de tipo macrófago, *in vitro* (Mumphrey *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2014).

2.5 Mecanismos inmunológicos que controlan las infecciones primarias por norovirus

La respuesta inmune innata juega un papel crítico en el control de las infecciones primarias. El interferón tipo I es necesario para prevenir infecciones graves e incluso letales, además de controlar la diseminación del virus a tejidos periféricos (Chang *et al.*, 2007). Trabajos realizados utilizando MNV han podido determinar algunos de los mediadores de la respuesta inmune que también interviene ante una infección por NoVs (Karst *et al.*, 2014). MDA5 puede detectar ARN de MNV, mientras que el factor de regulación del interferón 3 (IRF-3) e IRF-7 contribuyen al control de la replicación del MNV, al igual que el ISG15. Además de los interferones, recientemente se ha revelado que la interleucina 10 (IL-10) previene la inflamación de la mucosa y la interrupción de la barrera intestinal durante las infecciones por MNV (Changotra *et al.*, 2009).

Las infecciones por NoVs también pueden promover la respuesta inmune adaptativa. Estos pueden provocar respuestas de anticuerpos en la mucosa y el suero

(Johnson *et al.*, 1990). La evidencia en el modelo de ratón confirma que las células B y el anticuerpo antiviral son críticos para proteger contra las infecciones secundarias de norovirus (Basic *et al.*, 2014). También se estimulan las respuestas de los linfocitos T CD4 + y CD8 +, aunque sólo parecen ser necesarias las células T CD4 + para proteger ante una re-exposición (Changotra *et al.*, 2009).

No obstante la robustez de la respuesta inmunitaria protectora incluso entre cepas de virus estrechamente relacionadas, es variable. Esto puede deberse a vida corta de las respuestas inmunes protectoras (Karst, 2014). La inmunidad protectora a los MNV disminuye en seis meses y esto se correlaciona con la disminución de las respuestas de anticuerpos específicos del virus en ratones sometidos a re-exposición. De manera general un modelo matemático estima que la inmunidad a infecciones por HuNoVs dura de cuatro a nueve años (Robilotti *et al.*, 2015).

2.6 Vías de transmisión

Las rutas efectivas de transmisión de los HuNoVs son una de las principales causas del porqué estos virus son identificados como la causa más común de gastroenteritis no bacteriana a nivel mundial (Lopman *et al.*, 2012). La transmisión por la vía fecal-oral entre humanos es la más común. Sin embargo, también se puede transmitir a través de vómito de pacientes u otros fluidos, o transmisión mecánica dada por la presencia de superficies contaminadas (Bozkurt *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2009; Takahashi, *et al.*, 2011). Los aerosoles suelen ser la causa de la rápida propagación del virus en ambientes cerrados, como hospitales, hoteles, centros médicos, asilos de ancianos o guarderías. Las frutas frescas, y otros alimentos o el agua también son fuente común de contaminación (Kamimoto, *et al.*, 2014; Ryu *et al.*, 2015). Una vez en los alimentos, los HuNoVs pueden persistir por periodos extendidos en condiciones de congelamiento y refrigeración, así como a temperatura ambiente (Takahashi *et al.*, 2011).

También pueden ser fácilmente transmitidos por contacto con superficies animadas o inanimadas, como los equipos de preparación de alimentos, mesas, instrumentos o por contacto de manos contaminadas con cualquier superficie (Boxman *et al.*, 2009; Horm *et al.*, 2012). Se ha encontrado que algunas características de los NoVs permiten su fácil dispersión, como lo son que estos requieren una dosis de partículas virales relativamente baja (de 18 a 20 partículas), la propagación de las partículas virales persiste incluso después de la desaparición de

los síntomas, y el virus es estable incluso a concentraciones de 200ppm de cloro (Bae y Schwab, 2008; Patel *et al.*, 2009).

En 2014 fue reportado un brote de gastroenteritis en un internado donde el 95% de los individuos infectados habían consumido Kebab, en el cual la fuente de contaminación resultó ser la falta de higiene de los trabajadores encargados de prepararlo, (Lin, *et al.*, 2015). Entre el 2001 y 2008 se documentaron diversos brotes de gastroenteritis producidos por HuNoVs, asociados al consumo de ostras, ensaladas, sándwiches, o comida que se ingiere sin cocción (Robilotti *et al.*, 2015). Se ha reportado que en la mayoría de los brotes de gastroenteritis por HNoVestán implicados los trabajadores encargados de la elaboración del alimento (Repp *et al.*, 2013), los cuales incumplían con las medidas de seguridad e higiene como la utilización de guantes o asistían enfermos al trabajo (Kuo *et al.*, 2009).

La recopilación de datos epidemiológicos a partir de redes internacionales han permitido tener documentación sobre cómo las diferentes cepas de HNoVs están implicados en los brotes y cuáles fueron los modos de transmisión (Robilotti *et al.*, 2015). Las cepas del genotipo GII.4 causaron del 70-80% de todos los brotes reportados en los últimos 13 años, pero la prevalencia de genotipos infecciosos difiere entre las poblaciones humanas y las vías de transmisión (Hoa *et al.*, 2013).

El genotipo GII.4 se asocia más frecuentemente a la transmisión mediada por el contacto persona a persona que con otros tipos de transmisión, mientras que los otros (GI.3, GI.6, GI.7, GII.3, GII.6 y GII.12) se asocian principalmente a la transmisión por alimentos (Verhoef *et al.*, 2015). Las cepas del genogrupo GI están más asociadas con la transmisión por el agua que las cepas GII7, esto puede deberse a que las cepas GI tienen una mayor estabilidad en el agua que las cepas GII (de Graaf *et al.*, 2016). Las diferentes cepas virales pueden adaptarse a factores del huésped que varían de acuerdo con la población que infecta, como edad, salud e inmunidad preexistente, las diferencias en la epidemiología de los genotipos de norovirus en entornos comunitarios pueden influir en la evolución de los genotipos (Kroneman *et al.*, 2006; Lysen *et al.*, 2009)

2.7 Agentes neutralizantes de NoVs

Se ha estudiado la respuesta de virus sustitutos de HuNoVs a agentes o tratamientos inactivantes (Bozkurt *et al.*, 2015; Ryu *et al.*, 2015; Su y D'Souza,

2013). La inactivación de virus sustitutos a NoVs en superficies secas se ha realizado utilizando diferentes concentraciones de cloro y un solo tiempo de contacto (200 ppm en alimentos y de 1,000 a 5,000 ppm para superficies, FDA, 2011; Barclay *et al.*, 2014), sin embargo estos tratamientos solo logran la eliminación parcial del virus (Repp *et al.*, 2013).

Existen también reportes de utilización de métodos físicos como calor (63°C y 72 °C), radiación UV (40mWs/cm²), radiación ionizante (radiaciones Gamma 2 a 4 kGy) y altas presiones (375MPa a 21 °C por 5 min, Bozkurt *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2009), la efectividad de estos métodos depende de la dosis, el tiempo de exposición y la concentración viral. Los sustitutos de HuNoVs también se han utilizado para comparar el efecto de cloro y alcohol, generadores de yodo, peróxido de hidrogeno, ozono, aldehídos, compuestos con amonio cuaternario y surfactantes (Liu, *et al.*, 2010; Maury, *et al.*, 2007).

La eficiencia de todos estos tratamientos resulta variable dependiendo del tiempo de exposición, los sustitutos utilizados y la matriz de los alimentos o las superficies en las cuales se aplique (Gehrke *et al.*, 2004). Por esta razón los datos resultan difíciles de comparar entre ellos, y se puede concluir que al momento no existe un tratamiento adecuado para todos los casos, sobre todo cuando se analizan diferentes matrices de alimentos (Robilotti *et al.*, 2015).

Muchos polifenoles, flavonoides, proantocianinas y taninos producidos por plantas presentan actividad antimicrobiana, este es el caso de semillas de uva, granada, moras, frambuesas, arándanos, diversas bayas, ginseng, aceites esenciales de orégano, quitosán, y ácido cítrico se han reportado que pueden reducir la infectividad de HuNoVs (Gilling, *et al.*, 2014; Kamimoto *et al.*, 2014; Ryu *et al.*, 2015; Ueda *et al.*, 2013).

La actividad de semillas de uva (0.25, 0.5 y 1.0 mg/ml) fue probada en lechuga y jalapeño, utilizando los virus sustitutos de HuNoVs, el MNV-1 y FCV-F9 por periodos de exposición de entre 30s a 5 min disminuyendo la concentración de ambos virus en 2 y 3 log del inóculo inicial. Esto sugiere que el uso de compuestos naturales puede ser una opción viable para reducir HuNoVs (Su y D'Souza, 2013).

El extracto de granada que tiene una alta concentración de polifenoles y taninos y antocianinas en bajas concentraciones, también ha mostrado efectividad en la reducción de virus transmitidos por alimentos (Haidari, *et al.*, 2009; Neurath, *et al.*, 2004). La exposición de MNV-1 y FCV con extracto de granada a temperatura

ambiente por 1h, resultó en la disminución de las unidades formadoras de placa (PFU/ml, Su, *et al.*, 2011).

Algunos aceites esenciales, como los del orégano han sido probados contra FCV-F9 y MNV-1 produciendo la reducción de los títulos virales de manera dosis dependiente. De especial atención resultó la reducción de MNV1 producido al exponerse a carvacrol al 0.5%. Tanto carvacrol como el extracto de orégano provocaron una expansión de la cápside y pérdida de la integridad viral (Gilling *et al.*, 2014).

2.8 Prevención y control

La prevención de brotes por HuNoVs actualmente está dirigida principalmente a la identificación del modo de transmisión y la interrupción de la cadena de contagio mediante el aislamiento de los pacientes y la eliminación de alimentos contaminados, así como la descontaminación de agua (Patel *et al.*, 2009; Robilotti *et al.*, 2015). La industria alimenticia se ha vinculado a numerosos brotes de gastroenteritis, por lo que actualmente el saneo basado en soluciones de cloro es un método rutinario para remoción de patógenos (Takahashi *et al.*, 2011). Sin embargo se ha demostrado que este método no es completamente eficiente en la remoción de HuNoVs, ya que solo se logra la disminución de 1 a 1.5 log de concentración viral en productos frescos contaminados.

Las manos son las superficies más susceptibles a contaminarse por estas partículas y la magnitud de la dispersión de los viriones dependerá del sitio de infección, la naturaleza y descarga de las partículas y de los hábitos higiénicos del hospedero (Repp *et al.*, 2013). Un trabajador o persona infectada puede excretar partículas virales durante el período de incubación de la enfermedad e incluso después de haber remitido (Boxman *et al.*, 2009), por lo tanto el correcto lavado de las manos se encuentra entre las principales estrategias para la interrupción de la transmisión de HuNoVs (Sattar *et al.*, 2002; Tvedt y Bukholm, 2005). Para esto se recomienda el uso de jabón y agua corriente y hacer un lavado de al menos 20 s. No obstante, estudios experimentales han demostrado la facilidad con la que los virus pueden transferirse de las manos a alguna superficie animada o inanimada mediante un contacto leve (Boxman *et al.*, 2009). Las partículas virales se han podido recuperar de manos de trabajadores, fomites, mesetas y objetos de uso diario, esto dado por la alta permanencia que este virus puede tener en superficies animadas o

inanimadas. La cuantificación de HuNoVs en las manos de madres con hijos menores a cinco años, arrojó una prevalencia en aproximadamente 5% de los enjuagues de manos (Boxman *et al.*, 2009).

La evaluación de diferentes productos desinfectantes de manos es una prioridad actual. Un grupo de investigadores en Alemania utilizaron desinfectantes basados en alcohol (etanol, 1-propanol, y 2-propanol) en yemas de dedos artificialmente contaminadas con FCV y reportaron que el etanol y 1-propanol reducía la carga viral más que el 2-propanol. Sin embargo, las concentraciones necesarias para lograr estos resultados resultaron demasiado altas (Gehrke *et al.*, 2004). Otro estudio demostró que los lavados con agua y jabón fueron más eficientes que los desinfectantes basados en alcohol (Liu *et al.*, 2010).

Aunque los lavados con jabón y agua corriente son considerados prácticas adecuadas de descontaminación bacteriana, aún se presentan algunas dudas en cuanto a su eficacia para la eliminación de virus no envueltos (Sattar *et al.*, 2002). Se ha reportado que en los virus de la familia *Caliciviridae* (incluyendo HuNoVs), los geles basados en alcoholes no han resultado del todo eficientes, por lo que se continúa trabajando en el desarrollo de antivirales no tóxicos para su uso rutinario (Robilotti *et al.*, 2015; Sattar, *et al.*, 2011; Sattar *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2013).

El uso de geles desinfectantes de manos se ha extendido durante los últimos diez años, principalmente en hospitales, salas de cirugía y salas de asistencia a pacientes. En estas instalaciones se ha observado que tanto el personal médico de limpieza prefiere la utilización de geles desinfectantes al lavado de manos (Jones, *et al.*, 2000). Las principales ventajas de los geles es la facilidad de su uso y la alta capacidad de remoción en dependencia del agente desinfectante en que esté basado, además no es necesario el uso de agua lo cual agiliza la desinfección principalmente en zonas de difícil acceso a este recurso (Tvedt y Bukholm, 2005).

Los principales geles utilizados en las instalaciones hospitalarias y como método rutinario de desinfección, son los geles basados en alcoholes (Jones *et al.*, 2000).

Actualmente se siguen buscando compuestos con actividad antibacterial y antiviral que permitan optimizar la formulación de estos geles de manera que aumente su actividad antimicrobiana. De esta manera se puede interrumpir la cadena de transmisión de los HuNoVs disminuyendo su transmisibilidad y el número de casos asociados a infecciones por estos virus.

2.9 Compuestos flavonoides como agentes antivirales

Los flavonoides se encuentran comúnmente en verduras, frutas, nueces, especias y hierbas medicinales. Se sabe que los arándanos, moras, y frijoles rojos tienen un contenido de flavonoides particularmente alto (Wang y Mazza, 2002). Diferentes compuestos flavonoides tienen diferentes sustituyentes en los anillos A y B. De acuerdo con el nivel de oxidación y la sustitución del anillo C, los flavonoides se clasifican en seis clases: flavonas, flavonoles, flavonoles, flavononas y antocianinas (Erlund, 2004).

Es bien conocido el efecto anti-inflamatorio, antimicrobiano, anticancerígeno, antioxidante, antialérgico y antidiarreico de estos compuestos, por lo que su consumo se considera beneficioso para la salud (Abdullahi *et al.*, 2001). Se ha demostrado que muchos compuestos de este grupo presentan actividad antiviral contra virus de ARN como el virus de influenza A, de la inmunodeficiencia humana (VIH), rotavirus, poliovirus, virus coxsackie, el virus de la fiebre del dengue y el virus de la encefalitis japonesa (Hertog *et al.*, 1992). Aunque muchos polifenoles y antocianinas han sido estudiados demostrando ser los causantes de la actividad antiviral de los extractos herbales, la actividad antiviral de los compuestos polifenólicos de tipo flavonoides no ha sido examinada en detalle (Chang y George, 2007; Chen *et al.*, 2011).

La quercentina es uno de los flavonoides más ampliamente difundido entre los alimentos, estando presente en altas concentraciones ajo, manzana y el té. Además, numerosos productos fitomedicinales contienen quercetina o sus glucósidos (Erlund, 2004). La quercentina es un flavonoide tricíclico polihidroxilado, que en la naturaleza se encuentra glicosilado formando parte de la rutina (quercetin-3-rutinósido), de la isoquercitrina (quercetin-3-O-glucósido) o de otros glucósidos (Chenet *et al.*, 2011). Se ha reportado su efecto inhibitorio principalmente sobre bacterias Gram negativas (Jayaprakasha *et al.*, 2003). Además se ha demostrado que el extracto de té verde inhibe la replicación y expresión del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1). Algunos estudios también han demostrado la actividad antiviral de este extracto contra virus entéricos humanos (Su y D'Souza, 2013).

Otros flavonoides como la naringenina, la hesperedina y la vainillina se han utilizado en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad, síndrome metabólico y las afecciones que lo conforman, como la diabetes, la

hipercolesterolemia (obesidad) y la hipertensión (Fuhr *et al.*, 1998). La naringenina ha sido probada contra *L. monocytogenes*, *E. coli* O157: H7 y *S. aureus* y a pesar de no lograr una disminución significativa en su viabilidad, si redujo drásticamente la producción de acilhomoserina lactonas N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL) y N-butanoil-L-homoserina lactona (C4-HSL) producidos por bacterias Gram negativas y que están involucradas en la comunicación por *Quorum Sensing* entre bacterias (Ghosal *et al.*, 1996; Su y D'Souza, 2013; Erlund, 2004).

Se ha descrito cierto efecto antiviral de estos flavonoides principalmente contra HSV-1, HSV-2, el virus de Sindbis, y citomegalovirus (Ryu *et al.*, 2015). Kaul y Ogra (1985) fueron de los primeros autores en estudiar la acción de flavonoides en la replicación de diferentes virus humanos. Estos autores encontraron que dichos compuestos afectaron a uno o más de los procesos bioquímicos implicados en la replicación intracelular de los virus mucho más allá de la etapa de adsorción, principalmente en HSV-1. No obstante otros estudios no han mostrado un efecto antiviral de estos compuestos (Zadi *et al.*, 2013), por lo que se precisan más investigaciones para determinar la acción de estos compuestos sobre diferentes tipos de virus y en diferentes condiciones.

3. JUSTIFICACIÓN

La gastroenteritis tanto epidémica como esporádica presenta una alta morbilidad y mortalidad entre personas de todas las edades, causando de 5 a 8 millones de muertes al año. Esta enfermedad puede ser causada por HuNoVs, los cuales son la principal fuente de brotes epidémicos no bacterianos. La principal vía de transmisión de los HuNoVs es la fecal-oral, en la que las manos actúan como vehículos para diseminar el virus.

El correcto lavado de las manos resulta entre las principales estrategias para la interrupción de la transmisión de HuNoVs, sin embargo, ha resultado ser poco efectiva, ya que la reducción de la carga viral no es la adecuada. La sanitización basada en soluciones de cloro, que es utilizada ampliamente en la industria alimentaria, tampoco ha resultado suficiente para la remoción total del patógeno.

A la fecha no hay drogas aprobadas para la prevención o el tratamiento de estas enfermedades. Las principales estrategias de prevención están dirigidas a la interrupción de la cadena de contagio y disminución de la transmisibilidad del virus.

Recientemente se han realizado estudios de compuestos fitoquímicos y sustancias con actividad biológica anti-HuNoVs tales como polifenoles, flavonoides proantocianinas y taninos, los cuales han probado tener actividad anti-HuNoVs. Por esta razón la búsqueda y utilización de compuestos naturales con capacidad virucida puede reducir la transmisibilidad del virus al ser incorporados en un gel o solución desinfectante de manos.

4. HIPÓTESIS

Compuestos naturales (flavonoides) presentan capacidad de inactivación de Norovirus Murino.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de inactivación de norovirus por flavonoides (vainillina, naringenina, hesperedina, catequina, quercentina).

5.1 Objetivos específicos

- I. Establecer el cultivo de la línea celular RAW 264.7 y la producción de MNV.
- II. Estandarizar la cuantificación de MNV mediante la técnica de unidades formadoras de placas (PFUs) y RT-qPCR
- III. Evaluar la inactivación de MNV por efecto de compuestos naturales (vainillina, naringenina, hesperedina, catequina, quercentina).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de la línea celular de macrófagos RAW 264.7

Las células Raw 264.7 (ATCC, catálogo # TIB-71) fueron obtenidas comercialmente y cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle médium, Corning) suplementado con 10% de suero bovino fetal (BFS), 1% de antibiótico/antimicótico y 1% de aminoácidos no esenciales. La temperatura de incubación fue de 37°C con 5% de CO₂ como se describió anteriormente (Wobus *et al.*, 2004).

Para la proliferación de la línea celular, el medio original de crecimiento fue retirado y se agregó medio fresco cada 48h. Posteriormente se realizó el raspado de las células adheridas en el fondo de la caja usando un raspador de células y fueron resuspendidas y transferidas (1 ml) a una nueva caja. Las células se trabajaron a una confluencia aproximada del 70-80%. Se utilizaron cajas de 25cm².

6.2 Producción de partículas virales

Para este trabajo se utilizó a MNV como subrogados de HuNoV. Para la producción masiva de MNV se tomaron 20µl del virus MNV-1 CW1 (PTA-5935ATCC) obtenido comercialmente a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.05, y se pipeteó directamente en el medio. El virus se incubó durante una hora a 37°C con 5% de CO₂ para posteriormente retirar el medio y añadir medio fresco sin suplementar. Se realizó la incubación durante 48 h, observando el efecto citopático en las células cada 24 h.

Transcurridas 48 h las células fueron raspadas y pasadas a tubos Falcon de 15 ml y sometidas a tres ciclos de congelación/descongelación a -80°C y para posteriormente centrifugarlas a 4000rpm durante 5 min. Finalmente se recolectaron las células y fueron almacenadas alícuotas del sobrenadante donde se encontraban las partículas virales producidas. Fueron almacenadas a -80°C para su uso posterior.

6.3 Cuantificación viral mediante la técnica de TCID50 (Dosis de infección de cultivo de tejidos)

Se sembraron 1500 células Raw 264.7 en pocillos de una microplaca de 96 pozos (Corning incorporated). Después de que alcanzaron el 70% de confluencia se inocularon diluciones seriadas del virus recién producido y se incubó la placa nuevamente durante 48 h. Pasado este tiempo se observaron los pocillos para identificar el efecto citopático. El título se expresó como el 50% de las dosis infectante, que corresponde al recíproco de la dilución del virus que produjo la muerte en el 50% de los pozos infectados.

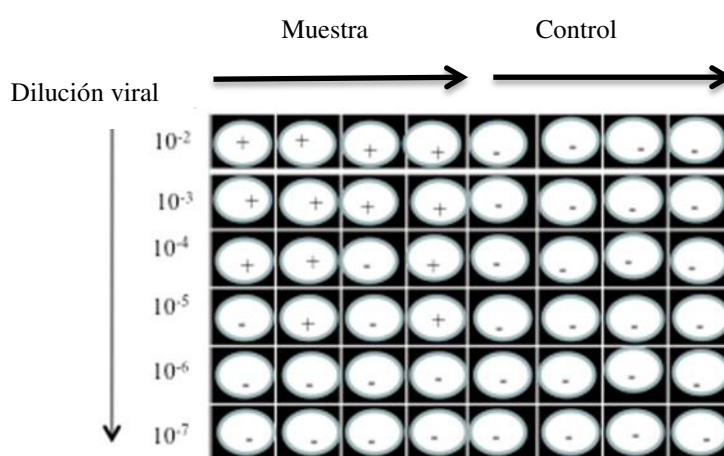


Fig.3. Esquema de la titulación viral mediante TCID50

$$h = (\% \text{ de pozos infectados en la dilución por encima del } 50\%) - 50\% / (\% \text{ de pozos infectados por encima del } 50\%) - (\% \text{ de pozos infectados por debajo del } 50\%)$$

6.4 Detección molecular del MNV producido

- **Extracción de ARN y síntesis de cADN.**

La extracción del ARN total a partir del raspado de las células se llevó a cabo tomando 500 µl del raspado celular y mezclándose con 500 µl de trizol (Molecular Research Center Inc.) e incubándose por 5 min a temperatura ambiente en viales de 1.5 ml. Posteriormente se agregaron 100 µl de cloroformo (Jalmark) y se agitó vigorosamente por 15s para posteriormente centrifugarse a 10000 rpm por 15min.

El sobrenadante se trasvasó cuidadosamente a nuevos viales y se agregaron 250 µl de alcohol isopropílico (Jalmark) dejándose incubar durante 10 min antes de

centrifugar nuevamente a 10000 rpm por 10 min. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 70%, el cual luego de secado se resuspendió en agua miliQ estéril. La pureza y concentración del ARN producido se midió en el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

La síntesis de cADN se realizó utilizando el kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD) según el siguiente protocolo de síntesis:

Tabla.1. Protocolo de síntesis de cADN

Etapa 1	Paso 1	Temperatura: 25°C por 5min Número de ciclos: 1
Etapa 2	Paso 1	Temperatura: 42°C por 5min
	Paso 2	Temperatura: 85°C por 5min, Número de ciclos: 1

- **Detección de MNV por reacción en cadena de polimerasa (PCR)**

Se realizó una PCR punto final en un volumen final de 20 µl. Los cebadores utilizados fueron 445/1/AS6 (TCCAGGATGACATAGTCCAGGGGCG)(SEQ ID NO:5) y 445/1/S6 (TGGGATGATTTCGGCATGGACAACG) a una concentración de 2 nM. La corrida de amplificación se realizó en el equipo PCR Express Thermo Hybaid, según el siguiente protocolo:

Tabla.2. Protocolo para la detección de MNV por PCR punto final

Etapa 1	Paso 1	Temperatura: 95°C por 1min, Número de ciclos: 1
Etapa 2	Paso 1	Temperatura: 95°C por 30s
	Paso 2	Temperatura: 62°C por 30s
	Paso 3	Temperatura: 72°C por 30s, Número de ciclos: 35

Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%; para lo cual 0.45g de agarosa (Oxoid) fueron disueltos en 30 ml de TBE1x (Trizma base [Sigma], Ácido Bórico [Sigma], EDTA [Sigma-Aldrich]). Se agregaron 2 µl de bromuro de etidio para la tinción del gel. Las muestras fueron corridas en cámara de electroforesis (Owl) utilizando una fuente de poder a 90V, y fueron observadas en fotodocumentador (El logic 2000, Kodak).

- **Cuantificación viral mediante RT-qPCR**

A partir del virus producido en el laboratorio se realizó una extracción del ARN con cloroformo mediante la metodología anteriormente descrita. Posteriormente se realizó la síntesis de cADN viral y se hicieron diluciones seriadas desde de 201.7 ng/μl hasta 0.0000002 ng/μl de cADN. Finalmente se midió la concentración de cADN en un termociclador PikoReal 96 (Thermo Scientific) utilizando el kit comercial iQ™ SYBR-Green Supermix (BIO-RAD). Los datos obtenidos permitieron la construcción de una curva estándar relacionando el ciclo de amplificación con la concentración de cADN. De esta curva se obtuvo la regresión lineal y la ecuación de la recta las cuales permitieron obtener el número de copias genómicas de MNV en la muestras. El número de copias se calculó mediante la fórmula (Staroscik; 2004).

$$\# = \frac{Xng \times 6.022E23 \text{ molécula}\mu\text{l/}}{(N \times 660 \text{ g/molécula}) \times 1E9ng/g}$$

Donde X=ng y N= longitud

Los ensayos se realizaron a las 48 h post-infección y se utilizó el termociclador PikoReal. La cuantificación se realizó mediante el kit iScript One-step RT-qPCR para SYBR-Green a partir de 2 μl de ARN viral con 20 μl master-mix y los cebadores a 2 nM de concentración final.

6.5 Cuantificación viral mediante la técnica de unidades formadoras de placas (UFP)

Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos (Corning Inc) a una concentración de 1×10^6 células por pozo, y una vez alcanzada una confluencia del 80% se inoculó con 0.5 ml del virus a la dilución previamente establecida en el ensayo de TCID50. Se incubó el virus durante 1h a 37 °C y 5% de CO₂, después de lo cual se retiró el medio de cultivo que contenía el virus y se agregó 1ml de agarosa Ultra Pure™ LMP (Invitogen) al 1.5% en cada pozo. Se dejó solidificar la capa de agarosa (especificada en la siguiente sección) por aprox 10 min a temperatura ambiente antes de colocar las placas en la incubadora. Las placas fueron revisadas a las 48 h de incubación.

- **Preparación de la agarosa de bajo punto de fusión**

Para preparar la agarosa, se suspendieron 3 g de agarosa, en 100 ml de agua destilada (3% p/v) y se esterilizó en la autoclave durante 20-30 min. Posteriormente se prepararon 100 ml de medio 2x MEM (suplementado con suero bovino fetal al 10%, 10 mM de HEPES, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 4 mM de L-glutamina). Posteriormente se mezcló la agarosa con el medio MEM 2x en una botella estéril en una proporción de 1:1 para lograr agarosa al 1%.

- **Visualización de placas virales mediante tinción con Rojo Neutro**

Para visualizar las placas, virales 1 ml de solución rojo neutro (3 ml de rojo neutro, 0.33% en PBS) se añadió a cada pocillo de la placa de 6 pozos directamente sobre la agarosa. Después de una hora de incubación a 37°C se visualizaron los pocillos y en aquellos que no fueron fácilmente visibles se dejaron incubando una hora más. El conteo se realizó colocando la placa boca abajo en un microscopio invertido (Olympus). Para calcular el título viral se sumó el número de placas presentes en los duplicados y se multiplicó por el factor de dilución.

6.6 Compuestos naturales

Los compuestos naturales polifenólicos de tipo flavonoide vainillina, naringenina, hesperidina, catequina y quercentina fueron adquiridos comercialmente (Sigma Aldrich). Estos fueron disueltos en etanol al 35% y mantenidos en oscuridad a -80 °C. Los flavonoides seleccionados ajustados a las concentraciones 125, 250 y 300 µM.

6.7 Ensayos de citotoxicidad

Se realizó empleando el método de reducción del MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetil-triazol-2-yl)-2, 5-difenil tetrazolio] reportado por Mossman (1983). El MTT se preparó a una concentración de 5mg/ml con amortiguador salino de fosfatos (PBS) a de 10mM

Las células con 80% de confluencia fueron raspadas y transferidas a placas de 96 pozos con fondo plano que contenían 15×10^3 células Raw 264.7 por pozo. Las

células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta obtener una confluencia de 80-90 %. Se agregaron 100 µl de los compuestos a 125, 250 y 300µM y se incubaron nuevamente por 1h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se eliminó el medio y se agregaron 22 µl de la solución de MTT y 100 µl de medio DMEM sin suero bovino fetal y se incubaron por 2 h. Se eliminó el MTT, y se adicionaron 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, J.T.Baker) y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific). Se calcularon los porcentajes de supervivencia relativa a las células control no tratadas y se obtuvieron los porcentajes de viabilidad celular para los compuestos probados.

6.8 Evaluación de la actividad antiviral por medio de RT-qPCR

Las células (1×10^3) Raw 264.7 se colocaron en placas de 12 pozos y se incubaron hasta alcanzar 80% de confluencia, posteriormente se les agregó una solución de 100 µl con 10^{-2} del MNV e inmediatamente se añadieron 100 µl de los compuestos antimicrobianos a probar (125, 250 y 300 µM).

Las placas fueron incubadas en oscuridad durante 1 h, al cabo de lo cual fueron retirados tanto el virus como el compuesto a probar, y a las células Raw 264.7 se les agregó medio fresco sin suero bovino fetal, incubándose por 48 h adicionales. Pasado este tiempo se realizó la extracción de ARN total con cloroformo de cada uno de los pozos y se realizó su cuantificación mediante el kit iScript One-step RT-qPCR para SYBR-Green (BIO-RAD).

6.9 Ensayo de actividad antiviral de los compuestos en un modelo de manos

Los compuestos naturales que mostraron mayor capacidad antiviral in vitro fueron probados en un modelo de manos para observar la posible capacidad de inactivación de MNV en yema de dedos contaminados artificialmente. Los compuestos fueron probados a 300 µM disueltos en etanol al 35%. La metodología seguida fue acorde a la norma E 1838–02 (Standard test method for determining the virus-eliminating effectiveness of liquid hygienic handwash and handrub agents using the fingerpads of adult volunteers).

Las manos de voluntarios fueron lavadas con agua y jabón y secadas con toallas de papel. Posteriormente fueron desinfectadas con etanol al 70%, frotándose hasta secarse. Cada yema fue presionada contra la boca de un criovial para demarcar el área de inoculación, 10µl de MNVs a una TCID₅₀/0.1ml de 10⁻² fue colocado en área marcada y se dejó por 20 min.

Dos yemas fueron utilizadas para cuantificar la cantidad de virus depositada, por lo que después de haberse secado, se lavó la región inoculada para realizar el recuento del virus. Otras dos yemas se expusieron a los compuesto a probar colocando un vial con 1 ml de la solución sobre la yema contaminada estando en contacto por aproximadamente 15 s. Finalmente se realizó la elusión del virus con medio DEMEM sin suplementar.

El eluido de cada una de las yemas fue inoculado en placas de 6 pozos con células Raw 264.7 previamente crecidas al 70% de confluencia. Se incubaron las placas durante 1h, luego de la cual se retiró el medio que contenía MNV y se agregó medio nuevo sin suero bovino fecal. Las placas fueron incubadas durante 48 h después de las cuales se realizó extracción y cuantificación de ARN mediante la metodología anteriormente descrita.

7. RESULTADOS.

7.1 Estandarización del cultivo de la línea celular Raw 264.7 y la producción de MNV

Se realizó la estandarización del cultivo de la línea celular Raw 264.7, y Se logró la proliferación y mantenimiento de las células. Los ensayos se llevaron a cabo cuando las células se encontraban a un 80% de confluencia y se realizaron pases sucesivos del cultivo cuando se lograba observar una monocapa celular (Fig.4).

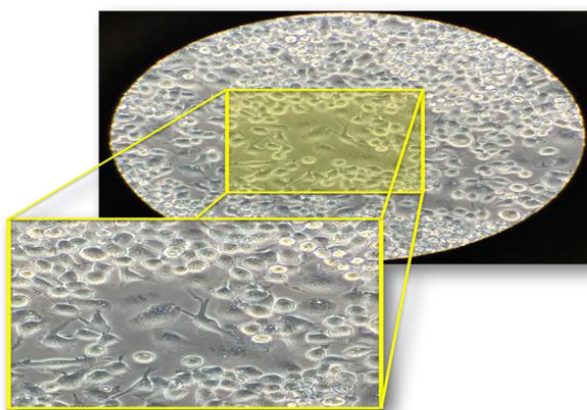


Fig. 4. Crecimiento y proliferación de la línea celular RAW 264.7 en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, e incubadas a 37°C, 95% O₂ y 5% CO₂. La observación se realizó en el objetivo 40X.

Se logró la estandarización de la producción masiva de MNV. Las células RAW 264.7 fueron permisivas a la infección y replicación de las partículas virales observando efecto citopático (ECP) provocado por la infección viral (Fig.5).

Las partículas virales pudieron ser detectadas mediante una PCR punto final, obteniendo un producto de 184 pb y se corroboró con los efectos citopáticos detectados en las células (Fig.6).

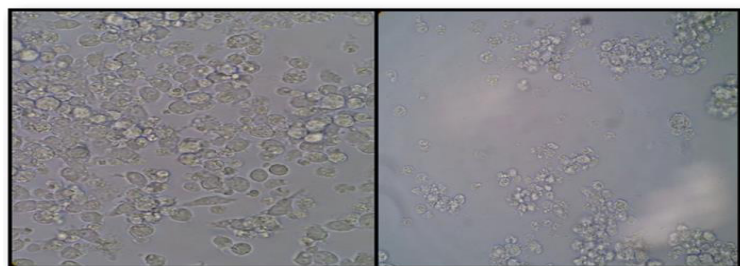


Fig. 5. Infección con MNV de la línea celular RAW 264.7. (Izq) Células sin infectar (Der) ECP de MNV en células RAW 264,7 a 72h post-infección.

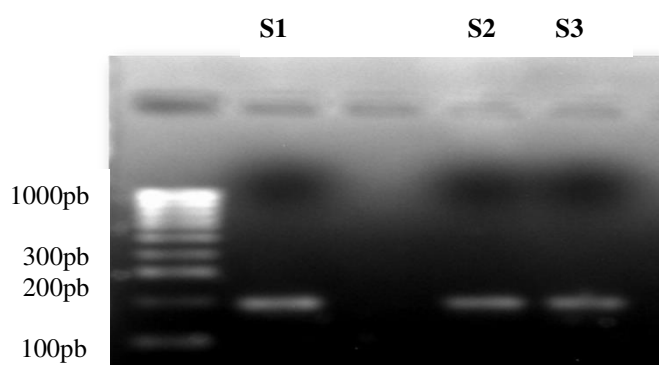


Fig. 6. Detección molecular de MNV.S1: Control positivo, S2 y S3: virus producido.

Se realizó la titulación del MNV mediante la determinación de TCID₅₀. Se estableció que el virus producido presentó una TCID₅₀/0.1ml de 10^{-2} (Fig.7).

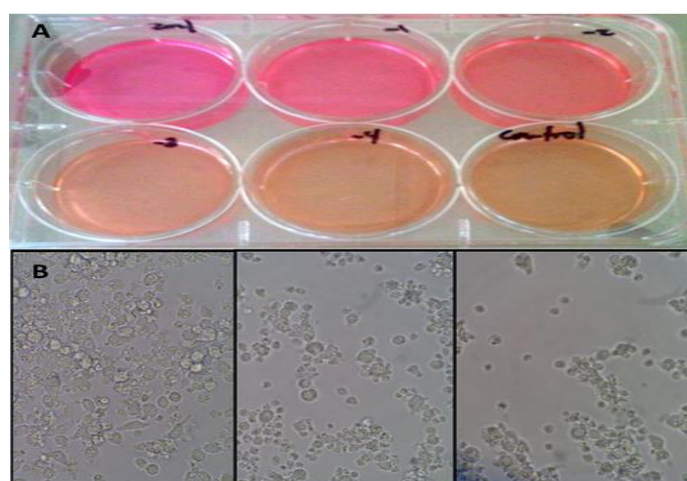


Fig. 7.A) Efecto citopático observado en el ensayo TCID₅₀ en placas de 6 pocillos. B) Observación microscópica de las células RAW264.7. Células sin infectar (Izq) células RAW264.7 infectadas con dilución -1. (Centro) células RAW264.7 infectadas con la dilución -2 (Der).

7.2 Cuantificación viral mediante Unidades formadoras de Placas (PFUs)

Se realizó la técnica de cuantificación mediante PFUs, observando la formación de placas formadas por el virus (Fig.8), sin embargo, no pudieron ser observadas macroscópicamente (Fig.9) por lo que la técnica no fue utilizada para la cuantificación viral.

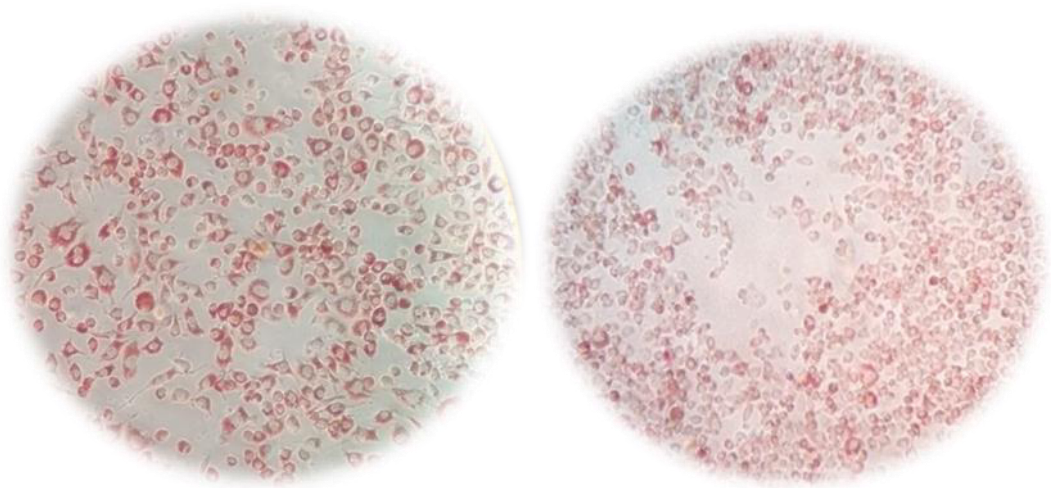


Fig. 8. Observación al microscopio de las placas formadas por MNV. A) Placas en el objetivo 40x y B) placas con el objetivo 20x

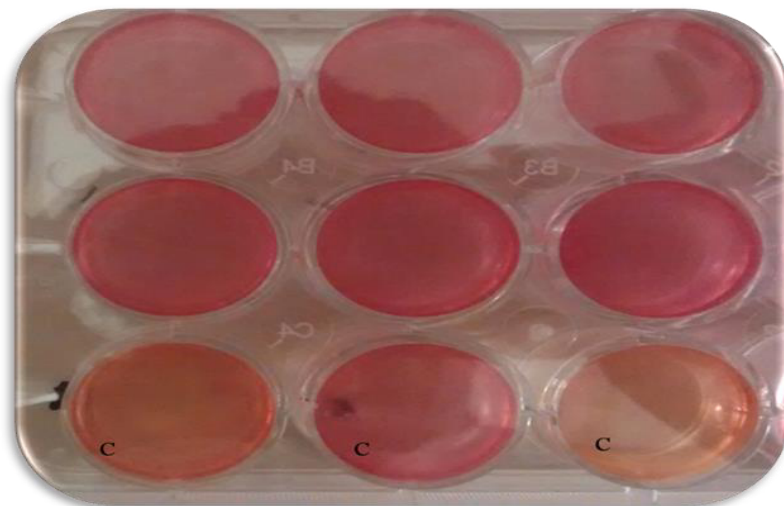


Fig. 9. Observación macroscópica de la técnica de PFUs. Las letras (c) representan los controles celulares.

7.3 Cuantificación viral mediante RT- q PCR.

Se realizó la curva estándar de cuantificación de MNV a partir de diluciones seriadas del cADN viral. La regresión lineal de la curva arrojó una R^2 de 0.9071 y la ecuación de la recta: $Y=-2.122X+29.93$ (Fig. 10).

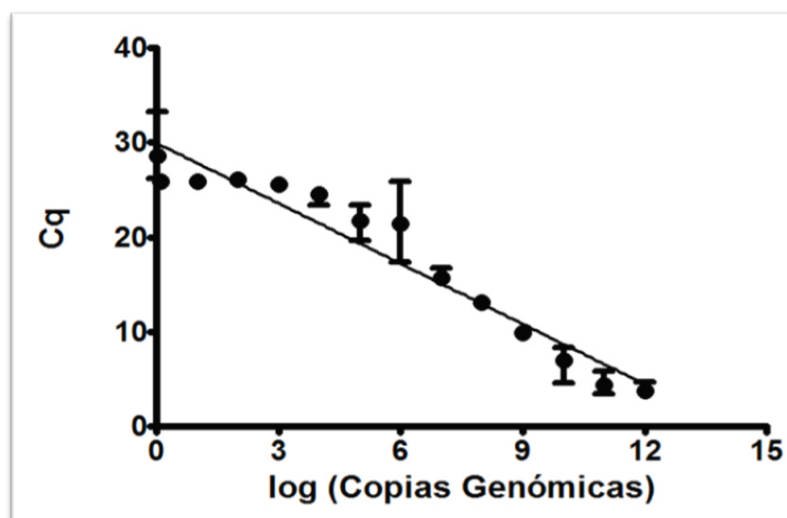


Fig. 10. Curva estándar de MNV.

7.1 Ensayo de citotoxicidad para los compuestos seleccionados.

Se realizaron ensayos de citotoxicidad para los compuestos que presentaron mayor capacidad de inactivación MNV a las concentraciones utilizadas en los ensayos.

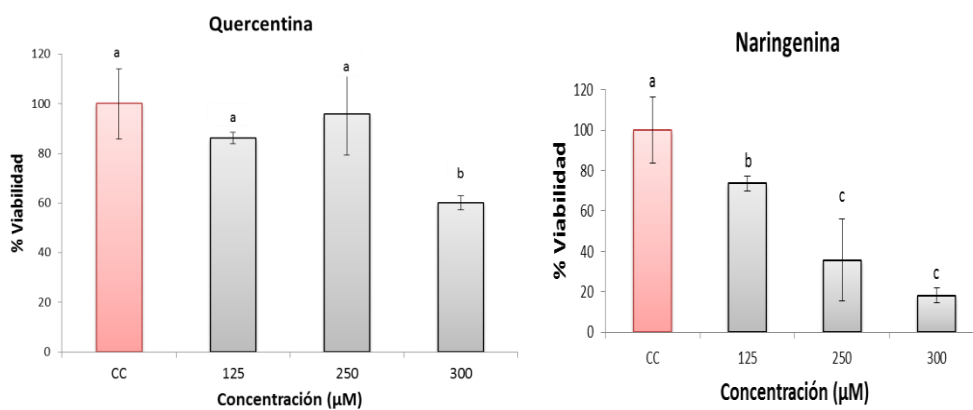


Fig.11. Porcentaje de viabilidad celular de la línea Raw 264.7 en presencia de Quercetina y Naringenina por 1h a tres concentraciones (125,250 y 300μM)

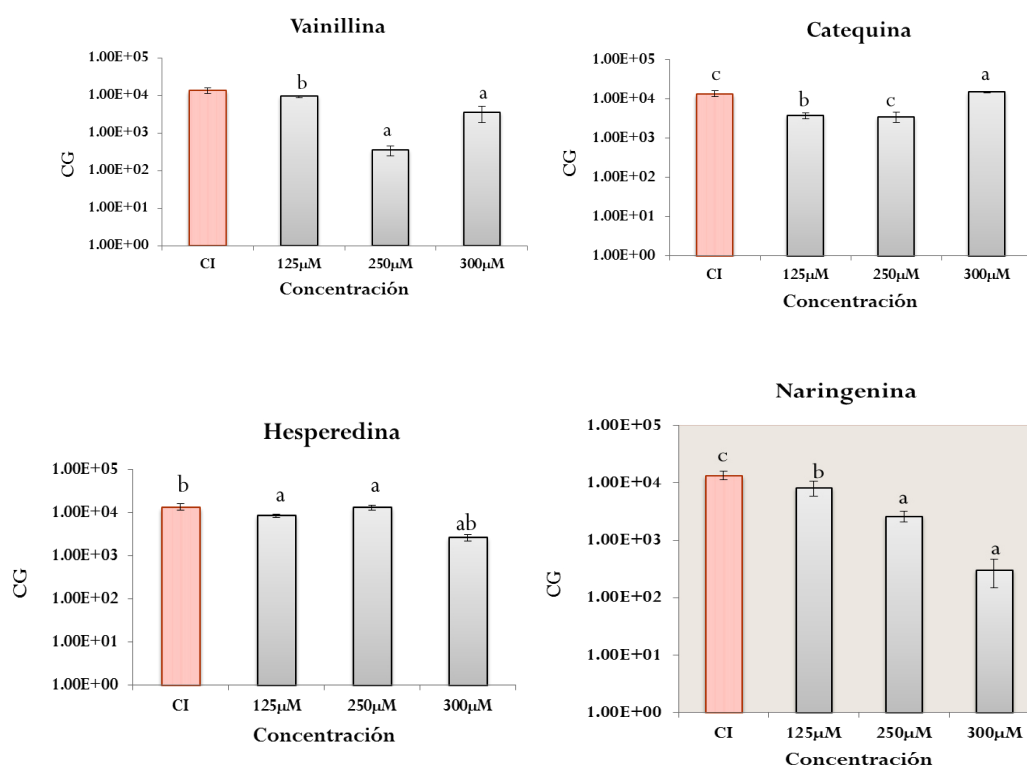
La quercetina no ejerció un efecto considerable en la viabilidad de las células Raw 264.7. No obstante a la concentración de 300uM se observó una disminución significativa ($p<0.05$) de la viabilidad del 60%, mientras que a las concentraciones de 125μM y 250 μM el porcentaje de viabilidad fue de 86 y 95%

respectivamente. No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los porcentajes de viabilidad del control celular, y las concentraciones de 125 y 250 μM .

La naringenina a 125, 250 y 300 μM disminuyó el crecimiento celular en un 73.67, 35.57 y 18.27% respectivamente. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la disminución de la viabilidad celular a las concentraciones de 125 y 300 μM con respecto al control, mientras que entre las concentraciones 250 y 300 μM no se evidenciaron.

7.2 Evaluación de la actividad antiviral de los flavonoides

Se realizó una solución en alcohol al 35% y cada compuesto fue incubado durante una hora con el virus y las células. Se graficó el número de copias genómicas de las tres concentraciones del compuesto (125, 250 y 300 μl) probadas



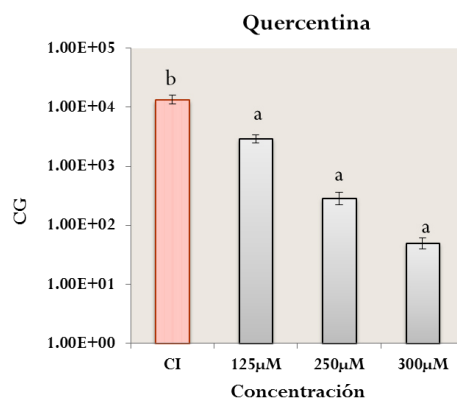


Fig.12.Efecto de los flavonoides (catequina, vainillina, hesperedina, naringenina y quercentina) a 125, 250 y 300µM sobre el número de copias genómicas del MNV, posterior a 1h de incubación.

Los compuestos naringenina y quercentina disminuyeron considerablemente el número de CGs virales con respecto al control infeccioso (CI), cuando fueron aplicados a una concentración de 300 µM. La disminución observada fue desde 13607.80 CG hasta 50.23 CG en el caso de quercentina y 8260 CG hasta 306 CG para naringenina.

Se observó un efecto concentración dependiente de la naringenina y quercentina. No se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las concentraciones de la quercentina. Tampoco se observaron diferencias en el efecto de la concentración media y alta de la naringenina, aunque si con respecto a la concentración de 125µM.

Los compuestos vainillina, catequina y hesperedina no mostraron inhibición del MNV y no se encontró relación entre la concentración de los compuestos y la inhibición de MNV. Los compuestos vainilina y catequina mostraron la mayor reducción a la concentración media, mientras que el compuesto hesperedina redujo la carga viral solamente a 125µM.

La reducción en el número de copias genómicas causado por vainillina en 259 µM no fue estadísticamente significativo con respecto a la concentración de 300 µM, pero si con 125 µM. La acción de catequina media 259 µM (3552 CG) fue diferente ($P < 0.05$) al observado en las otras concentraciones usadas (125 y 300 µM) en donde se detectaron 3775 y 15091 CG respectivamente, aunque no con respecto al control infeccioso (13607 CG). La hesperedina no presentó diferencias en la reducción del número de copias genómicas del MNV en las concentraciones probadas (8540 CG,

13268 CG y 2672 CG), solamente fue diferente al compararse con el control viral (13607 CG).

Se realizó una tabla en donde se resumen las copias genómicas por acción de cada compuesto a sus tres concentraciones (Tabla 1).

Tabla. 3. Comparación de las medias del número de copias genómicas de MNV entre los diferentes compuestos a las tres concentraciones analizadas. Letras iguales significa que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$).

Compuestos polifenólicos	Copias genómicas de MNV			
	Control infeccioso (MNV)	Concentraciones de compuestos polifenólicos (μM)		
		125	250	300
Vainillina	13607	953 ^{cd}	353 ^a	3590 ^{abc}
Naringenina		8260 ^{bcd}	2670 ^{ab}	306 ^a
Hesperedina		8540 ^{bcd}	13266 ^b	2670 ^{ab}
Catequina		3773 ^{abc}	3553 ^{abc}	10753 ^d
Quercentina		2124 ^{ab}	288 ^a	50 ^a

El análisis estadístico de la efectividad de los polifenoles para reducir al MNVs mostró que no existen diferencias entre la vainillina a 250 μM (353 CG), naringenina a 300 μM (306 CG) y quercentina a 250 y 300 μM (288 y 50 CG) que fueron los que mostraron mayor efecto sobre la viabilidad de los MNVs.

De acuerdo a los resultados obtenidos se eligieron los compuestos quercentina y naringenina como candidatos para ser ingredientes de un gel o solución con capacidad de inactivación de NoVs.

7.3 Evaluación de la actividad antiviral de los compuestos en un modelo de manos.

Se evaluó la actividad antiviral de quercentina y naringenina a 300 μM en un modelo de manos.

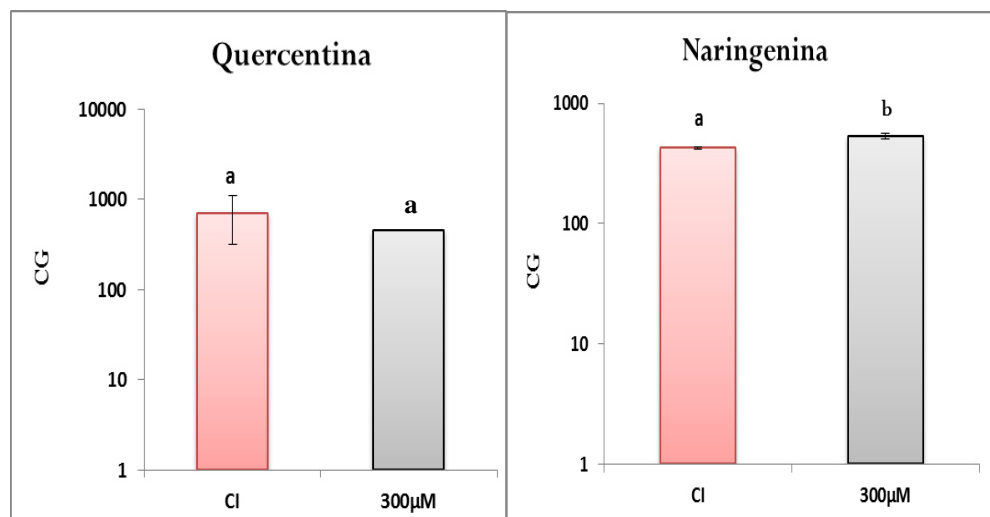


Fig.13. Capacidad de inactivación de MNV en un modelo de contaminación de manos. Los compuestos quercentina y naringenina se evaluaron a la concentración de 300 μ M, el tiempo de contacto entre virus y compuesto fue de 15s.

Las manos contaminadas artificialmente presentaron una carga viral inicial de 714 CG y 428 CG para quercentina y naringenina respectivamente. Posterior al tratamiento de las yemas con los compuestos se observó una disminución del número de copias virales (452) en el primer caso y un aumento (532) en el segundo. La disminución de CG observada posterior al tratamiento con quercentina no fue estadísticamente significativa, mientras que el aumento de CG virales posterior al tratamiento con naringenina si lo fue ($p < 0.05$).

8. DISCUSION.

Hasta la fecha se cree que el sitio primario de la infección y replicación de los HuNoVs es el intestino delgado, no obstante esto se basa en las características clínicas de la infección y no en evidencia experimental directa (Karst *et al.*, 2014). Se han realizado numerosos esfuerzos para cultivar NoV en células *in vitro*, sin embargo no se han podido detectar las partículas virales en enterocitos, por lo que la producción de MNV en cultivo de tejidos resulta imprescindible para los estudios de la biología de los HuNoVs (de Graaf *et al.*, 2016).

Trabajos realizados en los últimos años han demostrado que las células del sistema inmune del intestino son sensibles al ataque de MNV, detectándose estos virus en macrófagos, células dendríticas y células B *in vitro* e *in vivo* (Wobus *et al.*, 2004; Mumphrey *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2008).

La línea celular Raw 264.7 se origina de macrófagos de ratón y ha sido reportada como un tejido permisivo a la infección y replicación de MNV (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2012). Esta línea ha sido utilizada para la infección de HuNoVs y para la infección y proliferación de sustitutos virales como FCV, bacteriófago MS9 y MNV. Por estas razones se escogió para la infección, proliferación y producción de MNV-1.

Las células Raw 264.7 mostraron efecto citopático a las 48 h post infección, provocando lisis y desprendimiento de las células. También se producen alteraciones en la morfología celular dado por un aumento en las formaciones membranosas dentro de la célula (Robilotti *et al.*, 2015). Wobus y col (2009) reportaron que MNV presentaba ciclos de replicación líticos, en donde la replicación ocurre en citoplasma asociado a complejos membranosos de la célula hospedera. Esto coincidió con el efecto citopatogénico observado en las células desde las 48 h post infección.

La determinación del cambio en la morfología y desprendimiento de las células permitió la titulación viral por TCID₅₀. El virus producido en el laboratorio presentó 10² TCID₅₀/0.1ml, este título es menor al reportado por otros autores los cuales obtuvieron títulos de 10⁵ en la misma línea. Lewis y Metcalf (1988) recomendaron el uso de métodos de concentración para virus entéricos como la precipitación con polietilenglicol 6000. Estos autores señalaron a este método de concentración como eficaz para recuperar virus entéricos de muestras ambientales, así como para aumentar la concentración del mismo. También se ha recomendado la ultrafiltración

tangencial como un método rápido, eficaz, reproducible y sencillo (Katayama *et al.*, 2004).

Se realizó la detección molecular del genoma viral para verificar que el efecto citopático observado se debiera a la infección por MNV. Se realizó la síntesis de cADN a partir del ARN viral y se realizó una PCR final para la detección del virus. Los cebadores utilizados están dirigidos a la ARN dependiente-ARN polimerasa, la cual está codificado en el ORF1 del genoma de MNV.

Se obtuvo un amplicón de 184 pb aproximadamente, esto concuerda con los resultados reportados por Karst y col (2014), que han reportado un producto de entre 180 a 185 pb . También estos resultados coinciden con el análisis *in silico* realizado con el programa primer BLAST.

Múltiples técnicas se han utilizado para detectar infecciones virales en cultivo de tejidos, no obstante la cuantificación por la técnica de unidades formadoras de placas (UFPs) y RT-qPCR son de las más recomendadas (Wobus *et al.*, 2009; Karst *et al.*, 20014). Debido a esto estandarizamos la técnica de cuantificación viral por UFPs. Sin embargo las placas formadas por el virus no fueron apreciables macroscópicamente y resultaron difíciles de contar. Gonzalez-Hernandez y col (2012) reportaron la idoneidad de esta técnica para la cuantificación partículas infecciosas de MNV dado que presenta un límite de detección de 10 partículas virales, además dado que cada placa representa un solo virus, el ensayo de placa también puede usarse para purificar poblaciones clonales de MNV. No obstante también se ha reportado que no todas las cepas MNV son capaces de formar placas uniformes y apreciables (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2012).

Por otra parte Thackary y col (2007) reportaron la existencia de cepas de MNV con mínimo efecto citopático en la línea celular RAW 264.7. Algunas cepas forman placas muy pequeñas e irregulares difíciles de detectar con la tinción con el colorante rojo neutro, aunque si pueden visualizarse con la observación al microscopio, lo que fue similar a lo observado en el trabajo realizado.

Según Katayama y col (2004) otro factor que puede influir en la formación de la placa es el bajo título del virus producido y el efecto citopático en las células. El título viral del MNV producido en este trabajo fue de 10^2 TCID₅₀/0.1ml, el cual se considera bajo comparado con el título reportado por otros autores, lo cual pudiera haber influido en el bajo efecto citopático observado y en el tamaño de las placas formadas. Otros autores recomiendan la concentración del virus producido para

aumentar de esta manera el daño en el tejido celular. Por esta razón se decidió que esta técnica de cuantificación viral no era la más adecuada para utilizar en nuestro estudio

Para la cuantificación viral mediante RT-qPCR se realizó una curva estándar de MNV a partir de diluciones seriadas del cADN viral desde 201.7 ng/μl a 0.00000002 ng/μl y se obtuvo una regresión cuadrada de 0.907. La curva realizada permitió la cuantificación desde 1×10^{12} hasta 1×10^3 copias genómicas. La clonación del genoma viral en un vector plasmídico es otra de las metodologías reportadas que permiten una cuantificación absoluta del número de copias genómicas en la muestra. La utilización de un plásmido como vector puede permitir la obtención de curvas más precisas con valores por encima 0.95 (Wobus *et al.*, 2004; Ghilling *et al.*, 2014).

Los extractos de plantas contienen grupos de compuestos químicamente diversos que han sido ampliamente estudiados por la comunidad científica. Muchos de estos extractos se han utilizado en la medicina tradicional a través de los años, como conservadores de alimentos, así como en la industria farmacéutica, medicina alternativa y como fuente de nuevas drogas (Fang *et al.*, 2010).

En los últimos años ha crecido la demanda de compuestos derivados de plantas con actividad antimicrobiana, esto dado a un aumento en la resistencia a antibióticos convencionales por parte de los microorganismos, así como un aumento en la demanda de productos naturales por parte de la población (D'Souza, 2014; Robilotti *et al.*, 2015). Los extractos naturales o compuestos derivados de los mismos han surgido como alternativas para la prevención de la transmisión de virus entéricos como HuNoVs. En ausencia de un sistema de cultivo celular adecuado para propagar los HuNoVs, sustitutos virales cultivables como el calicivirus felino (FCV-F9), los bacteriófagos (MS2 o phiX174) y el norovirus murino (MNV-1), han sido utilizados para evaluar la actividad antiviral de estos compuestos naturales (Erlund, 2004; Fang *et al.*, 2010).

Los compuestos polifenólicos del tipo flavonoide son usualmente encontrados en frutas, vegetales, nueces y especias. Estos compuestos son conocidos por su actividad anti-inflamatoria, antimicrobiana, anti-cancerígena y antioxidante (Lee *et al.*, 2014). Los flavonoides escogidos en este trabajo fueron vainillina, naringenina, hesperedina, catequina y quercetina. La actividad anticancerígena y antioxidante de la hesperedina ha sido estudiada anteriormente, así como su participación en el metabolismo de lípidos (Fang *et al.*, 2010).

Los compuestos hesperedina y catequina no mostraron una disminución importante MNV a ninguna de las concentraciones probadas, a su vez tampoco se observó una relación entre la concentración de estos compuestos y la disminución de la carga viral.

Kaul y Ogra (1985) encontraron cierta actividad antiviral por exposición a hesperedina, principalmente contra PLV-I, Pf-3, RSV y HSV-1, aunque otros autores no han coincidido con esto (Zadi, et al., 2013).

Las catequinas son compuestos que se encuentran en altas concentraciones en el té verde, que ha mostrado una fuerte efecto antibacteriano, principalmente sobre bacterias Gram negativas y también se ha reportado cierto efecto en la inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) (D'Souza, 2014). Su y D'Souza (2011) encontraron que una disminución dosis dependiente de FCV-F9, MNV-1, bacteriófago MS2 y HAV se observaron al ser tratados con catequinas, este efecto puede deberse a la acción combinada de los diferentes compuestos polifenólicos presentes en el extracto y no a la acción de un solo compuesto (Robilotti *et al.*, 2015).

La vainillina es uno de los compuestos de los que menos se ha estudiado su actividad antiviral. Algunos autores mencionan que aunque posee cierta actividad antibacteriana su actividad antiviral es débil, esto coincide con los resultados obtenidos. Aunque se pudo observar una disminución ($P < 0.05$) del número de copias genómicas de MNV a la concentración media utilizada esta inhibición no fue dosis dependiente (Fang *et al.*, 2010).

La naringenina y la quercentina disminuyeron las copias genómicas de MNV desde 13607 hasta 50 CG en el caso de quercentina y de 8260 a 306 para naringenina. En ambos casos el efecto fue dosis dependiente.

Se ha descrito que la naringenina presenta efecto antiviral contra HSV-1, HSV-2, el virus de Sindbis, parainfluenzavirus- 3 y HCMV. No obstante su actividad contra virus desnudos no está ampliamente estudiada. Los resultados obtenidos en este estudio no coincidieron con los encontrados por otros autores que han reportado una débil actividad antiviral de este compuesto (Fang *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2015).

La quercentina es uno de los flavonoides más difundidos, estando presente en altas concentraciones en ajo, manzana y té. Este compuesto presenta una alta capacidad antioxidante y anticancerígena, además de actuar como antiinflamatorio y vasodilatador (Lee *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2010). También se ha demostrado ser un

potente agente antiviral, pudiendo interferir con la infectividad y replicación de adenovirus, coronavirus y rotavirus en cultivos celulares. El efecto inactivante de MNV mostrado en este trabajo coincide con lo reportado por Seo y col (2015) que observaron una disminución concentración dependiente de las UFPs para MNV y FCV. También reportaron un aumento en el efecto antioxidante en relación con la concentración utilizada (Williams, 2000; D'Souza, 2011).

La actividad antiviral de los compuestos naturales depende tanto de la concentración del virus como de la concentración de los compuestos, además los tiempos de exposición a los compuestos naturales también pueden influir en la actividad antiviral de los estos. Por esta razón los resultados pueden ser variables entre diferente estudios (Giliing *et al.*, 2014).

El modo de acción de estos compuestos aún no está claramente explicado. Algunos estudios evidencian que la principal acción virucida es actuando sobre la partícula viral incluso antes de la etapa de adsorción. No se ha observado un efecto inhibitorio en la replicación, ensamblaje o liberación de MNV. De modo general la acción de estos compuestos sobre virus envueltos es más clara, ya que se ha reportado que pueden actuar afectando la estructura de la envoltura viral, sin embargo pocos estudios han intentado dilucidar el mecanismo de acción sobre virus desnudos (Reichling *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2008; Astani *et al.*, 2011). Cliver (2009) mencionó que la cápside de los virus desnudos se ve afectada por estos compuestos sin que lleguen a causar daño en el ARN viral ya que la cápside de FCV expuesto a extracto de granada y extracto de uva mostró solo daños estructurales, no obstante esta información no es cuantificable por lo que es limitada (Gilling *et al.*, 2014).

De los compuestos analizados la quercentina en su concentración media y alta y la naringenina en su concentración alta fueron los más efectivos en la reducción MNV, y el efecto fue dosis dependiente. Por lo que ambos compuestos se tomaron como candidatos prometedores para usarse como ingredientes de una solución en gel o spray que permita reducir la transmisibilidad del virus.

Se realizó la evaluación de la viabilidad celular de la línea Raw 264.7 ante los dos compuestos seleccionados como candidatos. La quercentina no ejerció un efecto citotóxico importante sobre la viabilidad celular, la máxima disminución (60%) se observó a la mayor concentración. Este porcentaje de viabilidad se encuentra en los rangos aceptables según otros autores (Atsuo *et al.*, 2005). Sin embargo, la

naringenina afectó drásticamente la viabilidad celular en su concentración media y alta (35 y 18%), lo que contradice lo observado por otros autores ya que Seo y col (2015) mencionaron baja actividad antiviral de este compuesto así como bajo efecto citotóxico en la línea celular Raw 264.7 posterior a 2 h de exposición.

Se evaluó la capacidad de estos flavonoides para presentar efecto antiviral en un modelo de manos contaminadas artificialmente con MNV. Nuestros resultados mostraron una reducción significativa ($p < 0.05$) de una carga viral inicial de 714 CG a 452 CG posterior al tratamiento por 15s con quercentina. Sin embargo observamos un efecto opuesto con la naringenina, ya que de 428 CG aumentó a 532 CG después de la exposición aunque este aumento no fue significativo ($p < 0.05$). Esto último coincide con lo señalado por varios autores que mencionan el bajo efecto antiviral de la naringenina (Seo *et al.*, 2016; Erlund, 2004; Su and Souza, 2013). Esto aunado al efecto citotóxico que mostró en las células podría explicar el aumento del CG en los ensayos realizados en las manos.

Sattar y col (2011) reportaron que sanitizar las manos con soluciones alcohólicas podían reducir FCV en $< 1 \log_{10}$ UFPs y MNV en $2.8 \log_{10}$ UFPs. Esto difiere de lo encontrado en este estudio y donde esperábamos mayor efecto antiviral por efecto de los compuestos. Otros autores han mencionado que el uso de extractos de compuestos fitoquímicos puede disminuir hasta 3log las UFPs (Ryu *et al.*, 2015).

Las pequeñas variaciones en el CG causado por estos compuestos pueden estar dadas por desnaturalización de los compuestos flavonoides ya que se ha establecido que la efectividad de los compuestos polifenólicos depende de la preservación de la estabilidad de la molécula. Teniendo en cuenta que son compuestos sensibles a oxidación, luz y pH, diferentes autores recomiendan la encapsulación para preservar las características y actividades de los mismos (Erlund, 2004).

No obstante la disminución de CG por exposición a quercentina es un resultado preliminar que permite suponer la efectividad de este compuesto posterior a su encapsulación, al ser utilizado como ingrediente de soluciones desinfectantes o geles. Lo cual es congruente con lo reportado por diversos autores que destacan a la quercentina como un potente antimicrobiano (Su and Souza, 2013).

9. CONCLUSIONES

1. La quercentina y la naringenina a 300 μ M fueron los compuestos con mayor actividad anti-MNV logrando una reducción de hasta 2 log del número de copias genómicas *in vitro*.
2. La quercentina no mostró citotoxicidad en la línea celular Raw 264.7 a 125, 250 y 300 μ M mientras que la naringenina inhibió drásticamente la viabilidad celular a las mismas concentraciones.
3. La quercentina mostró una disminución de MNV en un modelo de manos contaminadas artificialmente, aunque esta disminución no fue significativa al compararse con el control.

10. PERSPECTIVAS

1. Ampliar el rango de concentraciones de los compuestos (quercentina, naringenina, catequina, hesperedina y vainillina) y realizar ensayos de actividad antiviral de los mismos.
2. Encapsulación del compuesto y formulación de un gel o solución desinfectante de manos
3. Análisis costo-beneficio de la producción del gel o solución desinfectante.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed SM. Hall AJ. Robinson AE. Verhoef, L., Premkumar P. Parashar UD. Koopmans M. Lopman BA. 2014. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 14, 725–730.
- Arts I C. van de Putte B, Hollman P C. 2000. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J Agric Food Chem*;48,1746-1751.
- Atsuo M M. Asaki N S. Aga K S. Aneko T.K. 2005. Cytotoxicity of Flavonoids toward Cultured Normal Human Cells 28, 253–259.
- Bae J. Schwab K J. 2008. Evaluation of Murine Norovirus , Feline Calicivirus , Poliovirus , and MS2 as Surrogates for Human Norovirus in a Model of Viral Persistence in Surface Water and Groundwater □ 74, 477–484.
- Baer L. Debevere J. Uyttendaele M. 2009. International Journal of Food Microbiology The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 83–94.
- Bailey D G. Dresser G K. Kreeft J H. Munoz C. Freeman D J. Bend J R. 2000. Grapefruit-felodipine interaction: effect of unprocessed fruit and probable active ingredients. *Clin Pharmacol Ther*;68,468-77.
- Bambrick H. Dear K. Woodruff R. Hanigan, I. McMichael A. 2008. The impacts of climate change on three health outcomes: Temperature-related mortality and hospitalizations, salmonellosis and other bacterial gastroenteritis, and population at risk from dengue. *Garnaut climate change review, Australia*, 59 pp.
- Barclay L. Park G W. Vega E. Hall A. Parashar U. Vinjé J. Lopman B. 2014. Infection control for norovirus. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 731–40.
- Basic M. Keubler L M. Buettner M D R N. Achard M. Breves G. Schröder B. Smoczek A. Jörns A. Wedekind D. Zschemisch, N. Günther, C. Neumann D. Lienenklaus S. Weiss S. Hornef, M W. Mähler, M. Bleich, A. 2014. Norovirus triggered microbiota-driven mucosal inflammation in interleukin 10-deficient mice. *Infamm Bowel Dis*; 20,431–443.
- Bok K. Green K Y. 2012. Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients. 2126–2132.
- Boxman I. Dijkman R. Verhoef L. Maat A. van Dijk G. Vennema H. Koopmans M. 2009. Norovirus on swabs taken from hands illustrate route of transmission: a case study. *J. Food Prot.* 72, 1753–5.

- Bozkurt H. D'Souza D H. Davidson P M. 2015. Thermal Inactivation of Foodborne Enteric Viruses and Their Viral Surrogates in Foods. *J. Food Prot.* 78, 1597–617.
- Chang K O. George D W. 2007. Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells. *Journal of Virology*, 81(22), 12111-12118.
- Changotra H. Jia Y. Moore T N, Liu G. Kahan S M. Sosnovtsev, S V. Karst S M. 2009. Type I and type II interferons inhibit the translation of murine norovirus proteins. *J Virol.* 83, 5683–5692.
- Chen L. Dou J. Su Z. Zhou H. Wang H. Zhou W. Quinglong G. Changlin Z. 2011. Synergistic activity of baicalein with ribavirin against influenza A (H1N1) virus infections in cell culture and in mice. *Antiviral Research.* 3, 314-320.
- Cremon C. De Giorgio R. Barbara G. Glass R I. Parashar U D. Estes M K. 2010. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 362, 557–8.
- de Graaf M. van Beek J. Koopmans M P G. 2016. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews | Microbiology.* 1-13.
- Debbink K. Costantini V. Swanstrom J. Agnihothram S. Vinjé J. Baric R. Lindesmith L. 2013. Human norovirus detection and production, quantification, and storage of virus-like particles, *Current Protocols in Microbiology.* 31,1-6.
- Debbink K. Lindesmith, L C. Baric R S. 2014. The state of norovirus vaccines. *Clin. Infect. Dis.* 58, 1746–1752.
- Deschner E E. Ruperto J. Wong G. Newmark H L. 1991. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis.* 12, 1193-1196.
- Donaldson E F. Lindesmith, L C. Lobue A D. Baric R S. 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 231–241
- Doultree J C. Druce J D. Birch C J. Bowden D S. Marshall J A. 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.* 41, 51–57.
- Duizer E. Bijkerk P. Rockx B. Groot A. De Twisk F. Koopmans M. 2004. Inactivation of Caliciviruses 70, 4538–4543.
- Eden J S. Hewitt J. Lim K L. Boni M F. Merif J. Greening, G. Ratcliff RM. Holmes E C. Tanaka M M. Rawlinson W D. White P A. 2014. The emergence and evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012. *Virology* 450-451, 106–113.

Erlund I. 2004. Review of the flavonoids quercetin , hesperetin , and naringenin . Dietary sources , bioactivities , bioavailability , and epidemiology 24, 851–874.

Ferry D R. Smith A. Malkhandi J. Fyfe D W. de Takats P G. Anderson D backer J. Kerr D J. 1996. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. Clin Cancer Res.2,659-668.

Food And Drug Administration Public Health Service U S Department Of Health And Human Services, 2011. Food and Drug Administration recommends against the continued use of propoxyphene. J. Pain Palliat. Care Pharmacother. 25, 80–2.

Gehrke C. Steinmann J. Goroncy-Bermes P. 2004. Inactivation of feline calicivirus, a surrogate of norovirus (formerly Norwalk-like viruses), by different types of alcohol in vitro and in vivo. J. Hosp. Infect. 56, 49–55.

Ghosal A. Satoh H. Thomas P E. Bush E. Moore D. 1996. Inhibition and kinetics of cytochrome P4503A activity in microsomes from rat, human, and cDNA-expressed human cytochrome P450. Drug Metab Dispos.24,940-947.

Gilling D H. Kitajima M. Torrey J R. Bright K R. 2014. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. J. Appl. Microbiol. 116, 1149–1163.

Goodfellow I. Karst S M. Zhu S. 2015. The molecular pathology of noroviruses The molecular pathology of noroviruses. J. Pathol. 235, 206–216.

Haidari M. Ali M. Ward S. Iii C. Madjid M. 2009. Phytomedicine Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. Phytomedicine 16, 1127–1136.

Hertog M G L. Hollman P C H. Katan M B. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly used in the Netherlands. J Agric Food Chem. 40,2379-2383.

Hoa T N. Trainor E. Nakagomi T. Cunliffe, N A. Nakagomi O. 2013. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. J. Clin. Virol. 56, 185–193.

Horm K M. Davidson P M. Harte F M. D’Souza D H. 2012 Survival and inactivation of human norovirus surrogates in blueberry juice by high-pressure homogenization. Foodborne Pathog Dis,9, 974-979.

Hsu C C. Riley Æ L K. Livingston Æ R S. 2007. Molecular characterization of three novel murine noroviruses 34, 147–155.

Jayaprakasha G K. Selvi T. Sakariah K K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vini ra*) seed extracts. Food Res Int, 36,117-122.

Jones R D. Jampani H. Mulberry C. Rizer R L. 2000. Moisturizing Alcohol Hand Gels for Surgical Hand Preparation. *Aorn J.* 7, 584–599.

Jones M K. Watanabe M. Zhu S. Graves C L. Keyes L R. Grau K R. Gonzalez-Hernandez M B. Iovine N M. Wobus C E. Vinjé J. Scott A. Wallet S M. Karst S M. 2014. Enteric bacteria promote human and murine norovirus infection of B cells. *Science.* 346,755–759.

Kamimoto M. Nakai Y. Tsuji T. Shimamoto T. Shimamoto T. 2014. Antiviral Effects of Persimmon Extract on Human Norovirus and Its Surrogate, Bacteriophage MS2. *J. Food Sci.* 79, 941–946.

Karst S M. 2014. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like. *Science.* 1575, 1575–1578.

Karst S. Zhu S. Goodfellow I G. 2014. The molecular pathology of noroviruses. *The Journal of Pathology.* 235, 206–216.

Kim H. Kwak I. Hwang I. Ko G. 2008. Optimization of methods for detecting norovirus on various fruit. *J. Virol. Methods* 153, 104–110.

Koo H L. Ajami N. Atmar R L. DuPont H L. 2010. Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discov. Med.* 10, 61–70.

Koopmans M. 2008. Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr. Opin. Infectious Dis.* 21, 544–552.

Kroneman A. Verhoef L. Harris J. Vennema H. Duizer E. van Duynhoven Y. Gray J. Iturriza M. Bo'ttiger B. Falkenhorst G. Johnsen C. von Bonsdorff C-H. Maunula L. Kuusi M. Pothier P. Gallay A. Schreier E. Ho'hne M. Koch J. Szucs G. Reuter G. Krisztalovics K. Lynch M. McKeown P. Foley B. Coughlan S. Ruggeri F M. Di Bartolo I. Vainio K. Isakbaeva E. Poljsak-Prijatelj M. Hocevar Grom A. Zimsek Mijovski J. Bosch, A. Buesa J. Sanchez Fauquier A. Hernandez-Pezzi G. Hedlund, K.-O. Koopmans M. .2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2959–296.

Li D. Baert L. Xia M. Zhong W. Jiang X. Uyttendaele M. 2012. Effects of a variety of food extracts and juices on the specific binding ability of norovirus GII.4 P particles. *J Food Prot.* 75, 1350- 1354.

Lin Y-C. Hipfl E. Lederer I. Allerberger F. Schmid D. 2015. A norovirus GII.P21 outbreak in a boarding school, Austria 2014. *Int. J. Infect. Dis.* 37, 25–29.

- Liu P. Yuen Y. Hsiao H M. Jaykus L A. Moe C. 2010. Effectiveness of liquid soap and hand sanitizer against Norwalk virus on contaminated hands. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 394–399.
- Lopman B. Gastañaduy P. Park G W. Hall A J. Parashar U D. Vinjé J. 2012. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Curr. Opin. Virol.* 2, 96–102.
- Lyse'n M. Thorhagen M. Brytting M. Hjertqvist M. Andersson Y. Kjell-Olof H. 2009. Genetic diversity among food-borne and waterborne norovirus strains causing outbreaks in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2411–2418
- Maury E. Goldwirt L. Rossi B. Offenstadt G. 2007. Comparison of the antibacterial efficacy and acceptability of an alcohol-based hand rinse with two alcohol-based hand gels during routine patient care. *J. Hosp. Infect.* 66, 167–173.
- Mccartney S A. Thackray L.B. Gitlin L. Gilfillan S. Iv H W V. Dc B M. 2008. MDA-5 Recognition of a Murine Norovirus. *PLOS Pathog.* 4, 1–8.
- Mcfadden N. Bailey D. Carrara G. Benson A. Chaudhry Y. Shortland A. Heeney J. Yarovsky F. Simmonds P. Macdonald A. Goodfellow I. 2011. Norovirus Regulation of the Innate Immune Response and Apoptosis Occurs via the Product of the Alternative Open Reading Frame 4. *PLOS Pathog.* 7, 1–24.
- Mumphrey S M. Changotra H. Moore T N. Heimann-nichols E R. Wobus, C.E., Reilly M J. Moghadamfalahi M. Shukla D. Karst S M. 2007. Murine Norovirus 1 Infection Is Associated with Histopathological Changes in Immunocompetent Hosts , but Clinical Disease Is Prevented by STAT1-Dependent Interferon Responses. *J. Virol.* 81, 3251–3263.
- Neurath A R. Strick N. Li Y. Debnath A K. 2004. Punica granatum (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry. *BMC Infect. Dis.* 12, 1–12.
- Patel M M. Hall A J. Vinjé J. Parashar U D. 2009. Noroviruses: A comprehensive review. *J. Clin. Virol.* 44, 1–8.
- Payne D C. Vinjé J. Szilagyi P G. Edwards K M. Staat M A. Weinberg G. Hall C.B. Chappell J. Bernstein D I. Curns A T. Wikswo M. Shirley S H. Hall A J. Lopman B. Parashar U D. 2013. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *N. Engl. J. Med.* 368, 1121–30.
- Repp K K. Hostetler T P. Keene W E. 2013. A norovirus outbreak related to contaminated surfaces. *J. Infect. Dis.* 208, 295–298.
- Robilotti E. Deresinski S. Pinsky B A. 2015. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 134–164.

- Ryu S. You H J. Kim Y W. Lee A. Ko G P. Lee S J. Song, M.J. 2015. Inactivation of norovirus and surrogates by natural phytochemicals and bioactive substances. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 65–74.
- Sattar S A. Ali M. Tetro J A. 2011. In vivo comparison of two human norovirus surrogates for testing ethanol-based handrubs: the mouse chasing the cat! *PLoS One* 6, 17340-1371.
- Sattar S A. Springthorpe V S. Tetro J. Vashon R. Keswick B. 2002. Hygienic hand antiseptics: Should they not have activity and label claims against viruses? *Am. J. Infect. Control* 30, 355–372.
- Scipioni A. Mauroy A. Ziant D. Saegerman C. Thiry E. 2008. A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. *Virol. J.* 5, 94–102.
- Semenza J C. Herbst S. Rechenburg A. Suk J E. Höser C. Schreiber C. Kistemann T. Semenza J C. Herbst S. Rechenburg A. Suk J E. Höser C. Schreiber C. Kistemann T. Change C. 2012. Technology Climate Change Impact Assessment of Food- and Waterborne Diseases. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 42, 857–890.
- Staroscik A. 2004. URI Genomics & Sequencing Center. On line. <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>
- Su X. D'Souza D H. 2013. Grape seed extract for foodborne virus reduction on produce. *Food Microbiol.* 34, 1–6.
- Su X. Sangster M Y. D'Souza D H. 2011. Time-Dependent Effects of Pomegranate Juice and Pomegranate Polyphenols on Foodborne Viral Reduction. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 1177–1183.
- Su X. Souza D H D. 2013. Naturally Occurring Flavonoids Against Human Norovirus Surrogates 97–102.
- Takahashi H. Ohuchi A. Miya S. Izawa Y. Kimura B. 2011. Effect of food residues on norovirus survival on stainless steel surfaces. *PLoS One* 6, 8–11.
- Thorne L G . Goodfellow I. G. 2014. Norovirus gene expression and replication. *J. Gen. Virol.* 95, 278–291.
- Thornton K A. Marín C. Mora-plazas M. 2013. Vitamin D Deficiency Associated With Increased Incidence of Gastrointestinal and Ear Infections in School-age Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* • 32, 585–593.
- Tirado M C. Clarke R. Jaykus L A. Mcquatters-gollop A. Frank J M., 2010. Climate change and food safety : A review. *Food Res. Int.* 43, 1745–1765.

- Tvedt C. Bukholm G. 2005. Alcohol-based hand disinfection : a more robust hand-hygiene method in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 59, 229–234.
- Ueda K. Kawabata R. Irie T. Nakai Y. Tohya Y. Sakaguchi T. 2013. Inactivation of Pathogenic Viruses by Plant-Derived Tannins: Strong Effects of Extracts from Persimmon (*Diospyros kaki*) on a Broad Range of Viruses. *PLoS One* 8, 1–10.
- Urashima M, Segawa T, Okazaki M, et al. Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr.* 2010;91:1255–1260.
- Vashist S. Bailey D. Putics A. Goodfellow I. 2011. UKPMC Funders Group Model systems for the study of human norovirus *Biology* 4, 353–367.
- Verhoef L. Hewitt J. Barclay L.. Ahmed S M. Lake R. Hall A J. Lopman B. Kroneman A. Vennema H. Vinjé J. Koopmans M. 2015. Norovirus genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999–2012. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 592–599.
- Vongpunsawad, S. Venkataram Prasad B V. Estes M K. 2013. Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. *J. Virol.* 87, 4818–4825.
- Wang J. Mazza G. 2002. Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS / IFN- γ -Activated RAW 264. 7 Macrophages. *J. Agric. an food Chem.* 50, 4183–4189.
- Wobus C E . Karst S M. Thackray L B. Chang K-O. Sosnovtsev S V. Belliot G. Belliot G. Krug A. Mackenzie J M. Green K Y. Virgin H W. 2004. Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. *PLoS Biol.* 12, 2076-2084.
- Wobus C.E. Thackray L B. Virgin H W. 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol.* 80, 5104–5112.
- Zheng D. Ando T. Fankhauser R L. Beard R S. Glass R I. Monroe S S. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312–323.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Dianelys Sotolongo Rodríguez

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: INACTIVACIÓN DE NOROVIRUS MEDIANTE COMPUESTOS NATURALES

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en la Habana, Cuba el 11 de Agosto de 1988, hija de Ignacio Sotolongo y Carelia Rodríguez.

Educación: Egresada de la Universidad de La Habana grado obtenido Licenciada en Microbiología.

Experiencia Profesional: Reserva Científica en el Centro de Investigaciones Pesqueras, Cuba.